

PCT/JP03/15641
05.12.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

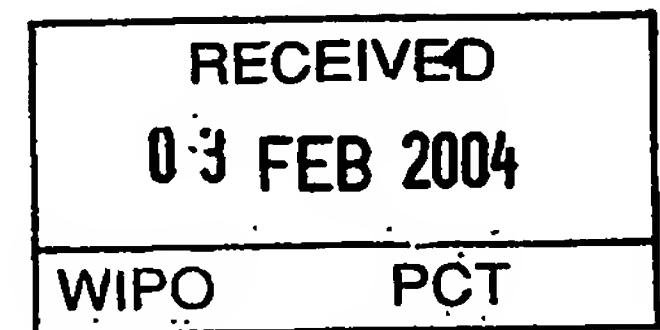
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 9月11日

出願番号
Application Number: 特願2003-320491
[ST. 10/C]: [JP2003-320491]

出願人
Applicant(s): 株式会社カルディオ

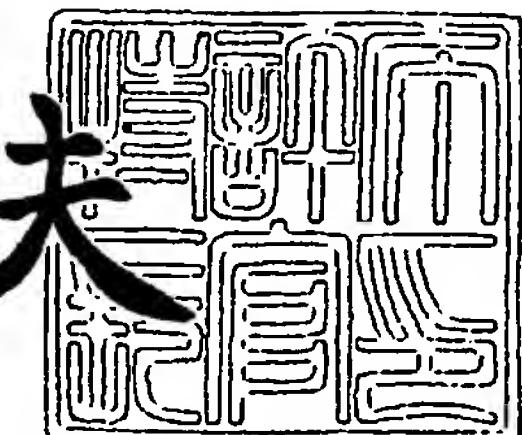


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3112251

【書類名】 特許願
【整理番号】 J103040339
【提出日】 平成15年 9月11日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61P
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県芦屋市大原町 20-5
 【氏名】 松田 晴
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県西宮市剣谷町 8-3
 【氏名】 澤 芳樹
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市都島区中野町 5-13-3-2804
 【氏名】 竹谷 哲
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府高槻市富田町 4-1-14 ハイツ富田 202号
 【氏名】 磐井 成光
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 709-36
 【氏名】 平川 公一郎
【特許出願人】
 【識別番号】 502100138
 【氏名又は名称】 株式会社カルディオ
【代理人】
 【識別番号】 100078282
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 山本 秀策
【選任した代理人】
 【識別番号】 100062409
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 安村 高明
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113413
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森下 夏樹
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2002-354342
 【出願日】 平成14年12月 5日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 001878
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0210100

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

生体適合性組織片であって、

- A) 生体分子；および
- B) 支持体、

を含む、生体適合性組織片（explant）。

【請求項2】

前記生体分子は、タンパク質を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片

【請求項3】

前記生体分子は、細胞生理活性物質を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項4】

前記生体分子は、細胞接着分子を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項5】

前記生体分子は、細胞外マトリクスを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項6】

前記生体分子は、細胞接着性タンパク質を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項7】

前記生体分子は、インテグリンを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項8】

前記生体分子は、コラーゲンおよびラミニンからなる群より選択される細胞外マトリクスを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項9】

前記生体分子は、纖維形成コラーゲンまたは基底膜コラーゲンを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項10】

前記生体分子は、纖維形成コラーゲンおよび基底膜コラーゲンを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項11】

前記生体分子は、コラーゲンI型またはIV型を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項12】

前記生体分子は、コラーゲンI型およびIV型を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項13】

前記支持体は、膜状である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項14】

前記支持体は、管状である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項15】

前記支持体は、弁状である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項16】

前記支持体は、生分解性ポリマーを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項17】

前記支持体は、ポリグリコール酸（PGA）、ポリL乳酸（PLA）およびポリカプロラクタム（PCLA）ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項18】

前記支持体は、グリコール酸と乳酸との比率が約90：約10～約80：約20であるPLGAを含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項19】

前記支持体は、細胞接着分子を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項20】

前記支持体は、タンパク質を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項21】

前記支持体は、メッシュ状およびスポンジ状である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項22】

前記支持体は、少なくとも約0.2mm～約1.0mm厚である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項23】

前記支持体は、少なくとも約20N以上の強度を有する、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項24】

前記支持体は、少なくとも約50N以上の強度を有する、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項25】

前記支持体は、前記生体分子でコーティングされている、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項26】

前記支持体は、隙間が前記生体分子で埋められている、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項27】

前記生体分子および前記支持体は、架橋可能な分子を含み、該架橋可能な分子は、該支持体と該生体分子との間で架橋処理されている、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項28】

前記支持体は、前記生体分子と同じ物質を含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項29】

さらに、細胞が付着した、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項30】

体内への移植用である、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項31】

前記体内における移植されるべき部位は、心臓、心臓弁、血管、心膜、心臓隔壁、心内導管、心外導管、硬膜、皮膚、骨、軟部組織および気管からなる群より選択される、請求項26に記載の生体適合性組織片。

【請求項32】

滅菌されている、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項33】

免疫抑制剤をさらに含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項34】

さらなる医薬成分をさらに含む、請求項1に記載の生体適合性組織片。

【請求項35】

前記生体分子は、前記移植を目的とする生体に由来する、請求項30に記載の生体適合性組織片。

【請求項36】

請求項1に記載の生体適合性組織片を含む、医薬。

【請求項37】

請求項1に記載の生体適合性組織片および該組織片の使用法を示した指示書を含む、医薬キットであって、該指示書には、所定の部位に該組織片を投与することが記載される、医薬キット。

【請求項38】

前記所定の部位は、血管内皮、血管平滑筋、弾性線維、骨格筋、心筋、骨芽細胞、神経細

胞および膠原線維からなる群より選択される、請求項37に記載の医薬キット。

【請求項39】

前記指示書には、前記生体適合性組織片を、移植を目的とする臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植することが記載される、請求項37に記載の医薬キット。

【請求項40】

体内における損傷部位を処置する方法であって、

A) 該損傷部位の一部または全部に、

 A-1) 生体分子；および

 A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項41】

前記移植工程において、前記生体適合性組織片は、前記損傷部位が属する臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植される、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

細胞生理活性物質を投与する工程をさらに包含する、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記細胞生理活性物質は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、multi-CSF（IL-3）、白血病抑制因子（LIF）、c-kitリガンド（SCF）、免疫グロブリンファミリーのメンバー、CD2、CD4、CD8、CD44、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、シンデカン、アグリカン、インテグリンファミリーのメンバー、インテグリン α 鎖、インテグリン β 鎖、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、セレクチン、カドヘリン、ICAM1、ICAM2、VCAM1、血小板由来増殖因子（PDGF）、表皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、肝細胞増殖因子（HGF）および血管内皮増殖因子（VEGF）からなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

免疫反応を抑制する処置を行う工程をさらに包含する、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

体内における臓器または組織を強化する方法であって、

A) 該臓器または組織の一部または全部に、

 A-1) 生体分子；および

 A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程、
を包含する、方法。

【請求項46】

臓器または組織を生産または再生する方法であって、

 A) 目的とする臓器または組織の少なくとも一部を含む生体において、該臓器または組織に、

 A-1) 生体分子；および

 A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程；ならびに

 B) 該臓器または組織を該生体内で培養する工程、
を包含する、方法。

【請求項47】

請求項1に記載の生体適合性組織片の、体内における損傷部位を処置するための使用。

【請求項48】

請求項1に記載の生体適合性組織片の、体内における臓器または組織を強化するための使

用。

【請求項49】

請求項1に記載の生体適合性組織片の、体内における損傷部位を処置するための医薬を製造するための使用。

【請求項50】

請求項1に記載の生体適合性組織片の、体内における臓器または組織を強化するための医薬を製造するための使用。

【請求項51】

生体適合性組織支持体であつて、

A) 粗面を有する第一層；および

B) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、支持体。

【請求項52】

前記第一層は、編物である、請求項51に記載の支持体。

【請求項53】

前記第二層は、織物である、請求項51に記載の支持体。

【請求項54】

前記粗面は、細胞が入り込むに充分なスペースを有する、請求項51に記載の支持体。

【請求項55】

前記封着は、生体吸収性高分子を融着することにより達成される、請求項51に記載の支持体。

【請求項56】

前記第二層は、通気性が実質的に遮断される、請求項51に記載の支持体。

【請求項57】

前記支持体の強度は、少なくとも100Nである、請求項51に記載の支持体。

【請求項58】

前記支持体の通気性は、 $10\text{ ml/cm}^2/\text{sec}$ 以下である、請求項51に記載の支持体。

【請求項59】

前記第一層は、生体分解性材料を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項60】

前記第一層は、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸(PLA)およびポリカプロラクタム(PCLA)ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項61】

前記第一層は、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10~約80:約20であるPLGAを含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項62】

前記第一層は、ポリグリコール酸を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項63】

前記第二層は、生体分解性材料を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項64】

前記第二層は、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸(PLA)およびポリカプロラクタム(PCLA)ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項65】

前記第二層は、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10~約80:約20であるPLGAを含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項66】

前記第二層は、ポリL乳酸を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項67】

前記第二層は、織物であり、前記第一層は編物である、請求項51に記載の支持体。

【請求項68】

前記第二層は、ポリL乳酸の織物であり、前記第一層は、ポリグリコール酸の編物である、請求項51に記載の支持体。

【請求項69】

前記接着は、C) 前記第一層と前記第二層とを封着する中間層による、支持体。

【請求項70】

前記中間層は、合成生体吸収性ポリマーである、請求項69に記載の支持体。

【請求項71】

前記中間層は、乳酸(ラクチド)、グリコリドおよびε-カプロラクタムからなる群より選択される少なくとも1つのモノマーのポリマーまたはそれらの2つ以上を含むコポリマーを含む、請求項69に記載の支持体。

【請求項72】

前記中間層を構成する材料は、前記第二層および前記第一層の両方の融点よりも低い融点を有する、請求項69に記載の支持体。

【請求項73】

前記第一層は、複数の編物層を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項74】

前記第二層は、複数の織物層を含む、請求項51に記載の支持体。

【請求項75】

前記第一層に、生体分子が配置される、請求項51に記載の支持体。

【請求項76】

前記生体分子は、細胞外マトリクスである、請求項75に記載の支持体。

【請求項77】

前記生体分子は、コラーゲンおよびラミニンからなる群より選択される細胞外マトリクスを含む、請求項75に記載の支持体。

【請求項78】

前記生体分子は、マイクロスponジに含ませて配置される、請求項75に記載の支持体。

【請求項79】

前記生体分子は、前記支持体と架橋処理されている、請求項75に記載の支持体。

【請求項80】

請求項51に記載の支持体を含む、医薬。

【請求項81】

細胞をさらに含む、請求項80に記載の医薬。

【請求項82】

体内への移植用途に使用される、請求項79に記載の医薬。

【請求項83】

前記体内における移植されるべき部位は、心臓、心臓弁、血管、心膜、心臓隔壁、心内導管、心外導管、硬膜、皮膚、骨、軟部組織および気管からなる群より選択される、請求項79に記載の医薬。

【請求項84】

前記生体分子は、前記移植を目的とする生体に由来する、請求項79に記載の医薬。

【請求項85】

A) 粗面を有する第一層；および

B) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を製造する方法であって、

該第一層と該第二層とを接着する工程、

を包含する、方法。

【請求項86】

前記接着は、C) 該第一層と該第二層とを封着する中間層により達成され、前記接着は

- a) 該第一層と該第二層との間に該中間層を提供する工程；
- b) 該第一層と該第二層とが融解せず、該中間層が融解する条件に該第一層、該第二層および該中間層を配置する工程；および
- c) 該第一層、該第二層および該中間層を所望の形状に保持しながら該中間層が固化する条件に配置する工程、

を包含する、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

前記融解する条件は、温度による違いを利用し、前記第一層および前記第二層の両方の融点より前記中間層の融点が低い、請求項86に記載の方法。

【請求項88】

前記第二層は、ポリL乳酸の織物であり、前記第一層は、ポリグリコール酸の織物であり、前記中間層は、乳酸（ラクチド）、グリコリドおよびε-カプロラクタムからなる群より選択される少なくとも1つのモノマーのポリマーまたはそれらの2つ以上を含むコポリマーを含む、請求項86に記載の方法。

【請求項89】

前記温度は、前記中間層の融点よりも高く、前記第一層および前記第二層のそれぞれの融点よりも低い、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

前記支持体は、さらに生体分子を含み、前記生体分子を前記第一層に付着させる工程をさらに包含する、請求項86に記載の方法。

【請求項91】

前記付着は、架橋処理を包含する、請求項90に記載の方法。

【請求項92】

前記生体分子はコラーゲンであり、前記付着は、コラーゲン架橋処理を包含する、請求項90に記載の方法。

【請求項93】

前記中間層は、ガラス上にキャストした後風乾してフィルムを作成することによって製造される、請求項86に記載の方法。

【請求項94】

前記b) 工程は、少なくとも約0.1 g/cm²の重りで上から圧力をかけることを包含する、請求項86に記載の方法。

【請求項95】

前記b) 工程は、少なくとも約0.5 g/cm²の重りで上から圧力をかけることを包含する、請求項86に記載の方法。

【請求項96】

体内における損傷部位を処置する方法であって、

A) 該損傷部位の一部または全部に、

A-1) 粗面を有する第一層；および

A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程、

を包含する、方法。

【請求項97】

体内における臓器または組織を強化する方法であって、

A) 該臓器または組織の一部または全部に、

A-1) 粗面を有する第一層；および

ることから、生体内での使用に必ずしも適しているとはいえない。

【0009】

このように、生体適合性のパッチなどとして使用可能な組織片または支持体は、現在のところ利用可能なものはまだない。

【0010】

また、特許文献1は、粒子状の強化媒体を含む生体高分子材料を開示するが、生体内への移植は意図していない。この材料は、アルブミンをアルデヒドで架橋することにより接着を行う生体用接着剤であり、これに補強剤を挟み込んでいる。しかし、組織の再生を意図していない。また、残存するアルデヒドによって傷害性があるなどの障害がある。

【0011】

特許文献2は、発泡体と補強材とからなる細胞の足場を開示するが、生体内への移植は意図していない。特に、この構成では、材料により物性が特定されてしまうという欠点を有する。また、この文献では、細胞を播種してから移植することを目的としているので、インビトロでの培養足場としての利用が考えられており、再生のための支持体としては考えられていない。

【0012】

特許文献3は、細胞の足場を開示するが、生体内への移植により臓器を補強、再生することは記載されていない。

【特許文献1】特開2002-543950号

【特許文献2】特開2001-78750号

【特許文献3】WO89/05371号

【非特許文献1】Carrel A., 1907, J Exp Med 9:226-8

【非特許文献2】Carrel A., 1912., J Exp Med 9:389-92

【非特許文献3】新岡俊治、今井康晴、瀬尾和宏ほか；テッシュエンジニアリングによる心血管材料の開発、応用。日心臓血管外会誌2000;29:38

【非特許文献4】Calne RY., 1970, Transplant Proc 2:550

【非特許文献5】Auchincloss 1988, Transplantation 46:1

【非特許文献6】Uretsky BF, Mulari S, Reddy S, et al., 1987, Circulation 76:827-34

【非特許文献7】Schmitz-Rixen T, Megerman J, Colvin RB, Williams AM, Abbot W., 1988, J Vasc Surg 7:82-92

【非特許文献8】Pliassonier D, et al., 1993, Arteriosclerosis Thromb 13:112-9

【非特許文献9】Rosenberg N, et al., 1956, Surg Forum 6:242-6

【非特許文献10】Dumont C, Pissoneill D, Michel J B., 1993, J Surg Res 54:61-69

【非特許文献11】Cosgrove DM, Lytle BW, Golding CC, et al., 1983, J Thorac Cardiovasc Surg 64:172-176

【非特許文献12】Broom N, Christie GW., 1982, In: Cohn LH, Gallucci V, editors. Cardiac prostheses: Proceedings of the Second International Symposium. New York: York Medical Books Pages 476-491

【非特許文献13】 Schoen F J, Levy R J, Piehler H R.
, Cardiovasc Pathology 1992; 1: 29-52

【非特許文献14】 J Thorac Cardiovasc Surg 1998
; 115; 536-46

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

従って、本発明は、生体の臓器または組織の損傷などの処置において、自己化するような組織片およびそれに使用することができる支持体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、従来は細胞を含ませることが必要であると考えられていた移植のための組織片の代わりに、生体分子と支持体とを含む生体適合性組織片を用いると、上述のような自己化する性質を具備することを予想外に発見したことにより上記課題を解決した。本発明はさらに、A) 粗面を有する第一層；B) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層；およびC) 該第一層と該第二層とを封着する中間層という構造を有する支持体が、予想外に組織再生に使用でき、耐久性も高く、生体親和度が高いこと、強度が充分であることを見出したことによって上記課題を解決した。

【0015】

本発明はまた、生体適合性であり得る縫物と織物との組織片層を重ね合わせ、中間層により封着する構造を提供することによって、縫物において見られた漏れの問題と、織物において見られたほつれの問題を、予想外に両方とも解決した。このように縫物と織物とを複合したことによって、さらに、細胞が入り込むスペースを有しつつ、漏れを防ぎ、解れが防止されている材料を予想外に提供することができた。さらに、このような支持体に生体分子（コラーゲンなど）を提供することによって、生体内に提供した場合に初期には細胞を呼び込み、その後その支持体自体は生体により分解され、消失し、実質的に跡形も残らない移植片を提供することができる。また、この複合支持体は、縫物と織物との作製において任意の方法を選択することによって、強度を保ち、一定の厚みを有することができる。さらに、縫みと織りに用いる糸に任意の材料を用いることによって、それぞれの吸収速度を制御することができ、さらには、組織の再生速度と支持体に必要な強度とに適合した支持体を作成することができるというように、種々の応用が考えられる。また、本発明では、1つの実施形態において、織物を使用することから、従来の支持体において欠点とされていた材料による物性の特定がなく、織り方によって物性を調節することができる一方で、強度を一定以上にすることができる。また、織物を使用する場合は、より簡単に、分解速度を調節する材料をより容易に選択し、自在に種々の支持体を作製することができることから、本発明は、従来よりも多様な支持体を提供することができる。

【0016】

従って、本発明は、以下を提供する。

【0017】

(1) 生体適合性組織片であって、

A) 生体分子；および

B) 支持体、

を含む、生体適合性組織片（explant）。

【0018】

(2) 上記生体分子は、タンパク質を含む、項目1に記載の生体適合性組織片

(3) 上記生体分子は、細胞生理活性物質を含む、項目1に記載の生体適合性組織片

。

【0019】

(4) 上記生体分子は、細胞接着分子を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0020】

(5) 上記生体分子は、細胞外マトリクスを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0021】

(6) 上記生体分子は、細胞接着性タンパク質を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0022】

(7) 上記生体分子は、インテグリンを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0023】

(8) 上記生体分子は、コラーゲンおよびラミニンからなる群より選択される細胞外マトリクスを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0024】

(9) 上記生体分子は、纖維形成コラーゲンまたは基底膜コラーゲンを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0025】

(10) 上記生体分子は、纖維形成コラーゲンおよび基底膜コラーゲンを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0026】

(11) 上記生体分子は、コラーゲンI型またはIV型を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0027】

(12) 上記生体分子は、コラーゲンI型およびIV型を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0028】

(13) 上記支持体は、膜状である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0029】

(14) 上記支持体は、管状である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0030】

(15) 上記支持体は、弁状である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0031】

(16) 上記支持体は、生分解性ポリマーを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

。

【0032】

(17) 上記支持体は、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸(PLA)およびポリカプロラクタム(PCLA)からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0033】

(18) 上記支持体は、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10～約80:約20であるPGLAを含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0034】

(19) 上記支持体は、細胞接着分子を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0035】

(20) 上記支持体は、タンパク質を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0036】

(21) 上記支持体は、メッシュ状およびスポンジ状である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0037】

(22) 上記支持体は、少なくとも約0.2mm～約1.0mm厚である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0038】

(23) 上記支持体は、少なくとも約20N以上の強度を有する、項目1に記載の生

体適合性組織片。

【0039】

(24) 上記支持体は、少なくとも約50N以上の強度を有する、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0040】

(25) 上記支持体は、上記生体分子でコーティングされている、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0041】

(26) 上記支持体は、隙間が上記生体分子で埋められている、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0042】

(27) 上記生体分子および上記支持体は、架橋可能な分子を含み、上記架橋可能な分子は、上記支持体と上記生体分子との間で架橋処理されている、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0043】

(28) 上記支持体は、上記生体分子と同じ物質を含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0044】

(29) さらに、細胞が付着した、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0045】

(30) 体内への移植用である、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0046】

(31) 上記体内における移植されるべき部位は、心臓弁、血管、心膜、心臓隔壁、心内導管、心外導管、硬膜、皮膚、骨、軟部組織および気管からなる群より選択される、項目26に記載の生体適合性組織片。

【0047】

(32) 滅菌されている、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0048】

(33) 免疫抑制剤をさらに含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0049】

(34) さらなる医薬成分をさらに含む、項目1に記載の生体適合性組織片。

【0050】

(35) 上記生体分子は、上記移植を目的とする生体に由来する、項目30に記載の生体適合性組織片。

【0051】

(36) 項目1に記載の生体適合性組織片を含む、医薬。

【0052】

(37) 項目1に記載の生体適合性組織片および上記組織片の使用法を示した指示書を含む、医薬キットであって、上記指示書には、所定の部位に上記組織片を投与することが記載される、医薬キット。

【0053】

(38) 上記所定の部位は、血管内皮、血管平滑筋、弾性線維、骨格筋、心筋、骨芽細胞、神経細胞および膠原線維からなる群より選択される、項目37に記載の医薬キット。

【0054】

(39) 上記指示書には、上記生体適合性組織片を、移植を目的とする臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植することが記載される、項目37に記載の医薬キット。

【0055】

(40) 体内における損傷部位を処置する方法であって、

A) 上記損傷部位の一部または全部に、

A-1) 生体分子；および

A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程、
を包含する、方法。

【0056】

(41) 上記移植工程において、上記生体適合性組織片は、上記損傷部位が属する臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植される、項目40に記載の方法。

【0057】

(42) 細胞生理活性物質を投与する工程をさらに包含する、項目40に記載の方法。

【0058】

(43) 上記細胞生理活性物質は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、multi-CSF(IL-3)、白血病抑制因子(LIF)、c-kitリガンド(SCF)、免疫グロブリンファミリーのメンバー、CD2、CD4、CD8、CD44、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、シンデカン、アグリカン、インテグリンファミリーのメンバー、インテグリン α 鎖、インテグリン β 鎖、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、セレクチン、カドヘリン、ICM1、ICAM2、VCAM1、血小板由来増殖因子(PDGF)、表皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝細胞増殖因子(HGF)および血管内皮増殖因子(VEGF)からなる群より選択される、項目42に記載の方法。

【0059】

(44) 免疫反応を抑制する処置を行う工程をさらに包含する、項目40に記載の方法。

【0060】

(45) 体内における臓器または組織を強化する方法であって、

A) 上記臓器または組織の一部または全部に、

A-1) 生体分子；および

A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程、
を包含する、方法。

【0061】

(46) 臓器または組織を生産または再生する方法であって、

A) 目的とする臓器または組織の少なくとも一部を含む生体において、上記臓器または組織に、

A-1) 生体分子；および

A-2) 支持体、

を含む、生体適合性組織片を移植する工程；ならびに

B) 上記臓器または組織を上記生体内で培養する工程、
を包含する、方法。

【0062】

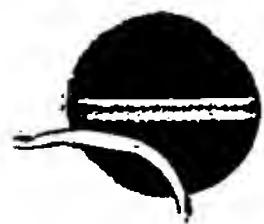
(47) 項目1に記載の生体適合性組織片の、体内における損傷部位を処置するための使用。

【0063】

(48) 項目1に記載の生体適合性組織片の、体内における臓器または組織を強化するための使用。

【0064】

(49) 項目1に記載の生体適合性組織片の、体内における損傷部位を処置するため



の医薬を製造するための使用。

【0065】

(50) 項目1に記載の生体適合性組織片の、体内における臓器または組織を強化するための医薬を製造するための使用。

【0066】

(51) 生体適合性組織支持体であって、

A) 粗面を有する第一層；および

B) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、支持体。

【0067】

(52) 上記第一層は、編物 (knit) である、項目51に記載の支持体。

【0068】

(53) 上記第二層は、織物 (woven) である、項目51に記載の支持体。

【0069】

(54) 上記粗面は、細胞が入り込むに充分なスペースを有する、項目51に記載の支持体。

【0070】

(55) 上記封着は、生体吸収性高分子を溶着することにより達成される、項目51に記載の支持体。

【0071】

(56) 上記第二層は、通気性が実質的に遮断される、項目51に記載の支持体。

【0072】

(57) 上記支持体の強度は、少なくとも100Nである、項目51に記載の支持体。

。

【0073】

(58) 上記支持体の通気性は、 $10\text{ ml/cm}^2/\text{sec}$ 以下である、項目51に記載の支持体。

【0074】

(59) 上記第一層は、生体分解性材料を含む、項目51に記載の支持体。

【0075】

(60) 上記第一層は、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリL乳酸 (PLA) およびポリカプロラクタム (PCLA) ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、項目51に記載の支持体。

【0076】

(61) 上記第一層は、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10～約80:約20であるPLGAを含む、項目51に記載の支持体。

【0077】

(62) 上記第一層は、ポリグリコール酸を含む、項目51に記載の支持体。

【0078】

(63) 上記第二層は、生体分解性材料を含む、項目51に記載の支持体。

【0079】

(64) 上記第二層は、ポリグリコール酸 (PGA)、ポリL乳酸 (PLA) およびポリカプロラクタム (PCLA) ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分を含む、項目51に記載の支持体。

【0080】

(65) 上記第二層は、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10～約80:約20であるPLGAを含む、項目51に記載の支持体。

【0081】

(66) 上記第二層は、ポリL乳酸を含む、項目51に記載の支持体。

【0082】

(67) 上記第二層は、織物であり、上記第一層は編物である、項目51に記載の支持体。

【0083】

(68) 上記第二層は、ポリL乳酸の織物であり、上記第一層は、ポリグリコール酸の編物である、項目51に記載の支持体。

【0084】

(69) 上記接着は、C) 上記第一層と上記第二層とを封着する中間層による、項目51に記載の支持体。

【0085】

(70) 上記中間層は、合成生体吸収性ポリマーである、項目69に記載の支持体。

【0086】

(71) 上記中間層は、乳酸(ラクチド)、グリコリドおよびε-カプロラクタムからなる群より選択される少なくとも1つのモノマーのポリマーまたはそれらの2つ以上を含むコポリマーを含む、項目69に記載の支持体。

【0087】

(72) 上記中間層を構成する材料は、上記第二層および上記第一層の両方の融点よりも低い融点を有する、項目69に記載の支持体。

【0088】

(73) 上記第一層は、複数の編物層を含む、項目51に記載の支持体。

【0089】

(74) 上記第二層は、複数の織物層を含む、項目51に記載の支持体。

【0090】

(75) 上記第一層に、生体分子が配置される、項目51に記載の支持体。

【0091】

(76) 上記生体分子は、細胞外マトリクスである、項目75に記載の支持体。

【0092】

(77) 上記生体分子は、コラーゲンおよびラミニンからなる群より選択される細胞外マトリクスを含む、項目75に記載の支持体。

【0093】

(78) 上記生体分子は、マイクロスponジに含ませて配置される、項目75に記載の支持体。

【0094】

(79) 上記生体分子は、上記支持体と架橋処理されている、項目75に記載の支持体。

【0095】

(80) 項目51に記載の支持体を含む、医薬。

【0096】

(81) 細胞をさらに含む、項目80に記載の医薬。

【0097】

(82) 体内への移植用途に使用される、項目79に記載の医薬。

【0098】

(83) 上記体内における移植されるべき部位は、心臓、心臓弁、血管、心膜、心臓隔壁、心内導管、心外導管、硬膜、皮膚、骨、軟部組織および気管からなる群より選択される、項目79に記載の医薬。

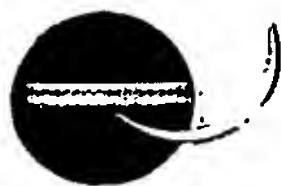
【0099】

(84) 上記生体分子は、上記移植を目的とする生体に由来する、項目79に記載の医薬。

【0100】

(85) A) 粗面を有する第一層；および

B) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、



を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を製造する方法であって、

項目第一層と項目第二層とを接着する工程、
を包含する、方法。

【0101】

(86) 上記接着は、C) 項目第一層と項目第二層とを封着する中間層により達成され、上記接着は、

a) 項目第一層と項目第二層との間に項目中間層を提供する工程；
b) 項目第一層と項目第二層とが融解せず、項目中間層が融解する条件に項目第一層、項目第二層および項目中間層を配置する工程；および
c) 項目第一層、項目第二層および項目中間層を所望の形状に保持しながら項目中間層が固化する条件に配置する工程、
を包含する、項目85に記載の方法。

【0102】

(87) 上記融解する条件は、温度による違いを利用し、上記第一層および上記第二層の両方の融点より上記中間層の融点が低い、項目86に記載の方法。

【0103】

(88) 上記第二層は、ポリL乳酸の織物であり、上記第一層は、ポリグリコール酸の織物であり、上記中間層は、乳酸(ラクチド)、グリコリドおよびε-カプロラクタムからなる群より選択される少なくとも1つのモノマーのポリマーまたはそれらの2つ以上を含むコポリマーを含む、項目86に記載の方法。

【0104】

(89) 上記温度は、上記中間層の融点よりも高く、上記第一層および上記第二層のそれぞれの融点よりも低い、項目88に記載の方法。

【0105】

(90) 上記支持体は、さらに生体分子を含み、上記生体分子を上記第一層に付着させる工程をさらに包含する、項目86に記載の方法。

【0106】

(91) 上記付着は、架橋処理を包含する、項目90に記載の方法。

【0107】

(92) 上記生体分子はコラーゲンであり、上記付着は、コラーゲン架橋処理を包含する、項目90に記載の方法。

【0108】

(93) 上記中間層は、ガラス上にキャストした後風乾してフィルムを作成することによって製造される、項目86に記載の方法。

【0109】

(94) 上記b) 工程は、少なくとも約0.1g/cm²の重りで上から圧力をかけることを包含する、項目86に記載の方法。

【0110】

(95) 上記b) 工程は、少なくとも約0.5g/cm²の重りで上から圧力をかけることを包含する、項目86に記載の方法。

【0111】

(96) 体内における損傷部位を処置する方法であって、

A) 項目損傷部位の一部または全部に、

A-1) 粗面を有する第一層；および

A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程、
を包含する、方法。

【0112】

(97) 体内における臓器または組織を強化する方法であって、

A) 項目臓器または組織の一部または全部に、

　A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程、
を包含する、方法。

【0113】

(98) 臓器または組織を生産または再生する方法であって、

A) 目的とする臓器または組織の少なくとも一部を含む生体において、項目臓器または組織に、

　A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程；ならびに

B) 項目臓器または組織を項目生体内で培養する工程、
を包含する、方法。

【0114】

(99) A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における損傷部位を処置するための使用。

【0115】

(100) A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における臓器または組織を強化するための使用。

【0116】

(101) A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における損傷部位を処置するための医薬を製造するための使用。

【0117】

(102) A-1) 粗面を有する第一層；および

　A-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、

を含み、項目第一層と項目第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における臓器または組織を強化するための医薬を製造するための使用。

【発明の効果】

【0118】

本発明により、細胞など生体に由来する自己増殖性のものを用いることなく、自己化する組織片が提供された。そのような組織片を移植することで、臓器または組織の再生がみられたことはかつてなく、予想外の効果が達成された。また、従来の縫物、織物において見出された欠点が克服された生体適合性支持体が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0119】

以下、本発明を発明の実施の形態とともに説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

【0120】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0121】

本明細書において使用される「再生」（regeneration）とは、個体の組織の一部が失われたあるいは先天的に欠損している際に残った組織が自発的にまたは他からの助けを借りて増殖して復元される現象をいう。本明細書では、再生は、例えば、損傷した組織または臓器に生体内の細胞などが集合しその細胞などが増殖もしくは増幅することによっても生じ得る現象も指す。従って、再生という概念は、広く、動物種間または同一個体における組織種に応じて、再生のその程度および様式は変動する。ヒト組織の多くはその再生能が限られており、大きく失われると完全再生は望めない。大きな傷害では、失われた組織とは異なる増殖力の強い組織が増殖し、不完全に組織が再生され機能が回復できない状態で終わる不完全再生が起こり得る。この場合には、生体内吸収性材料からなる構造物を用いて、組織欠損部への増殖力の強い組織の侵入を阻止することで本来の組織が増殖できる空間を確保し、さらに細胞増殖因子を補充することで本来の組織の再生能力を高める再生医療が行われている。この例として、軟骨、骨および末梢神経の再生医療がある。神経細胞および心筋は再生能力がないかまたは著しく低いとこれまで考えられてきた。近年、これらの組織へ分化し得る能力および自己増殖能を併せ持った組織幹細胞（体性幹細胞）の存在が報告され、組織幹細胞を用いる再生医療への期待が高まっている。胚性幹細胞（ES細胞）はすべての組織に分化する能力をもった細胞であり、それを用いた腎臓、肝臓などの複雑な臓器の再生が試みられている。このように、幹細胞自体を注入した組織などの再生方法は魅力的な方法である。従って、本発明の組織片には、このような幹細胞が含まれていてもよい。

【0122】

本明細書において「自己化」とは、移植において用いられる場合、移植された組織片が、宿主の臓器または組織の一部として機能するようになることをいう。従って、自己化とは、例えば、ある組織片が自己増殖する能力を獲得すること、材料やデバイスをつくり上げる際に、人が手を加えなくても、材料やデバイスの構成要素が自ら集まってある構造をとったり、エネルギーや物質が拡散していく動的過程の中で構成要素が自ら進んであるパターンを形成したりすること（周囲組織との生態適合性を有すること、異物反応を最小限に抑える（炎症反応、内膜増殖、硬化、石灰化）こと成長の可能性を有すること）などという現象を含むがそれに限定されない。本明細書において移植片または組織片が自己化したかどうかは、例えば、フォンビルブランド因子、 α -SMA、弾性組織についてのエラスチカ・ファン・ギーソンなどのように、自己細胞の増殖を確認するマーカーを用いて判定することができる。

【0123】

具体的には、移植片が自己化したかどうかを判定する方法としては、例えば、細胞のパターン形成および自己配置の状況として組織学的検索、免疫反応の有無、細胞の集合体の精密合成として電気的結合性の測定、超音波検査による機能測定、ヒドロプロリンアッセイ、エラスチックアッセイ、DNAアッセイ、細胞数定量化、蛋白質定量化、グリコサミノグリカンアッセイ、ミオシン重鎖アッセイという方法を用いることができるが、それらに限定されない。例えば、血管の場合、血管新生が起こっているかどうかで自己化したかどうかを判定することができる。そのような血管新生は、例えば、第VIII因子関連抗原等で免疫組織化学染色した後に血管数を計数することによって判定される。この計数方法では、検体を10%の緩衝化ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、各々の検体から数個の連続切片を調製し、凍結する。次いで、凍結切片をPBS中の2%パラホルムアルデヒド溶液で5分間、室温にて固定し、3%過酸化水素を含むメタノール中に15分間浸漬し、次いでPBSで洗浄する。このサンプルをウシ血清アルブミン溶液で約10分間覆って、非特異的反応をロックする。検体を、HRPと結合する、第VIII因子関連抗原に対するEPOS結合体化抗体と共に一晩インキュベートする。サンプルをPBSで洗浄した後、これらを、ジアミノベンジジン溶液（例えば、PBS中、0.3mg/mlジアミノベンジジン）中に浸漬して、陽性染色を得る。染色された血管内皮細胞を、例えば

、200倍の倍率の光学顕微鏡下で計数し、例えば、計数結果を、1平方ミリメートルあたりの血管の数としてあらわす。特定のサイトカインおよび増殖因子の処置後、血管数が統計学的に有意に増加しているか否かを判定することにより、血管新生活性を判定することができる。望ましくは、パッチクランプ法などによる細胞の集合体の精密合成として電位の測定、電気密度解析のような電気生理的な測定により宿主細胞と同じ電気生理的活性を有することによって、組織片が自己化しているかどうかを確認する。そのような電気的結合性を有している場合、本明細書において、そのような状態を「電気的自己化」ともいう。

【0124】

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子およびその集合体をいう。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。生体分子は、生体から抽出される分子およびその集合体を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与える分子およびその集合体であれば生体分子の定義に入る。したがって、医薬品として利用され得る低分子（たとえば、低分子リガンドなど）もまた生体への効果が意図され得るかぎり、生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など）、これらの複合分子、およびその集合体（例えば、細胞外マトリクス、線維など）などが包含されるがそれらに限定されない。本発明では、生体分子は、移植を目的とする宿主に適合性があるか、または適合するように処置され得ることが好ましい。ある生体分子が宿主に適合性または適合するように処置され得るかあるかどうかは、その生体分子をその宿主に移植して、必要に応じて免疫拒絶反応などの副反応を抑制することによりその宿主に定着するかどうかを観察することによって、判定することができる。本発明において使用される好ましい生体分子としては、例えば、細胞外マトリクスのような細胞との親和性を有するものが挙げられる。別の好ましい実施形態では、本発明では、生体分子として、細胞を誘引する機能を有するものが挙げられる。

【0125】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーおよびその改変体をいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされ得るものもを包含する。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。本発明の組織片において使用される場合は、「タンパク質」は、その組織片が使用されるべき宿主において適合性のあるタンパク質であることが好ましいが、その宿主において適合するように処置され得る限り、どのようなタンパク質を用いてもよい。あるタンパク質が宿主に適合性があるかどうか、または宿主において適合するように処置され得るかどうかは、そのタンパク質をその宿主に移植して、必要に応じて免疫拒絶反応などの副反応を抑制することによりその宿主に定着するかどうかを観察することによって、判定することができる。代表的には、上述の適合性があるようなタンパク質としては、その宿主に由来するタンパク質を挙げることができるがそれに限定されない。

【0126】

本明細書において「細胞生理活性物質」または「生理活性物質」（physiolog

ically active substance) とは、細胞または組織に作用する物質をいう。そのような作用としては、例えば、その細胞または組織の制御、変化などが挙げられるがそれに限定されない。生理活性物質には、サイトカインおよび増殖因子が含まれる。生理活性物質は、天然に存在するものであっても、合成されたものでもよい。好ましくは、生理活性物質は、細胞が産生するものまたはそれと同様の作用を有するものであるが改変された作用を持つものであってもよい。本明細書では、生理活性物質はタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

【0127】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制禦作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。

【0128】

本明細書において用いられる「増殖因子」または「細胞増殖因子」とは、本明細書では互換的に用いられ、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。

【0129】

サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壞死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝実質細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) のような増殖活性を有するものが挙げられる。

【0130】

サイトカインおよび増殖因子などの生理活性物質は一般に、機能重複現象 (redundancy) があることから、他の名称および機能 (例えば、細胞接着活性または細胞-基質間の接着活性など) で知られるサイトカインまたは増殖因子であっても、本発明に使用される生理活性物質の活性を有する限り、本発明において使用され得る。また、サイトカインまたは増殖因子は、本明細書における好ましい活性 (例えば、宿主の細胞を呼び寄せる活性) を有してさえいれば、本発明の組織片または医薬の好ましい実施形態において使用することができる。

【0131】

本明細書において「細胞外マトリクス」 (ECM) とは「細胞外基質」とも呼ばれ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞 (somatic cell) の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、組織の支持だけでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に関与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン (酸性ムコ多糖) であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン (酸性ムコ多糖-タンパク複合体) の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のミクロフィブリル (microfibril)、線維、細胞表面のフィプロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。本発明において用いられる細胞外マトリクス

としては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィプロネクチン、ラミニン、弹性纖維、膠原纖維などが挙げられるがそれに限定されない。本発明において用いられる場合、細胞外マトリックスは、好ましくは、宿主の自己細胞を呼び寄せる活性を持っていることが有利である。

【0132】

本明細書において「細胞接着分子」(Cell adhesion molecule) または「接着分子」とは、互換可能に使用され、2つ以上の細胞の互いの接近(細胞接着) または基質と細胞との間の接着を媒介する分子をいう。一般には、細胞と細胞の接着(細胞間接着) に関する分子 (cell-cell adhesion molecule) と、細胞と細胞外マトリックスとの接着(細胞-基質接着) に関する分子 (cell-substrate adhesion molecule) に分けられる。本発明の組織片では、いずれの分子も有用であり、有効に使用することができる。従って、本明細書において細胞接着分子は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質(例えば、インテグリンなど)も含まれ、タンパク質以外の分子であっても、細胞接着を媒介する限り、本明細書における細胞接着分子または細胞接着分子の概念に入る。

【0133】

細胞間接着に関しては、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する多くの分子(NCAM、L1、ICAM、ファシクリンII、IIIなど)、セレクチンなどが知られており、それぞれ独特な分子反応により細胞膜を結合させることも知られている。

【0134】

他方、細胞-基質接着のために働く主要な細胞接着分子はインテグリンで、細胞外マトリックスに含まれる種々の蛋白質を認識し結合する。これらの細胞接着分子はすべて細胞膜表面にあり、一種のレセプター(細胞接着受容体)とみなすこともできる。従って、細胞膜にあるこのようなレセプターもまた本発明の組織片において使用することができる。そのようなレセプターとしては、例えば、 α インテグリン、 β インテグリン、CD44、シンデカンおよびアグリカンなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0135】

なお、本明細書では、インテグリンなどの結合の相手となる細胞外マトリックス分子(フィプロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性蛋白質)も細胞接着分子の範疇に入る。それぞれの接着受容体の、細胞間接着、細胞-基質接着における機能分担は厳密なものではなく、相手となる分子(リガンド)の分布によって変動する。例えば、インテグリンのあるものは血球間の接着など細胞間接着にも関与する。また、増殖因子、サイトカインなどが細胞膜タンパク質として存在する場合、他の細胞に分布するそれらのレセプターとの反応が、結果として細胞を接着させることができることから、そのような増殖因子、サイトカインもまた、本発明の組織片に含まれる生体分子として使用することができる。

【0136】

このように多種多様な分子が細胞接着に関与しており、それぞれの機能は異なっていることから、当業者は、目的に応じて、適宜本発明の組織片に含まれるべき分子を選択することができる。細胞接着に関する技術は、上述のものほかの知見も周知であり、例えば、細胞外マトリックス 一臨床への応用一 メディカルレビュー社に記載されている。

【0137】

ある分子が細胞接着分子であるかどうかは、生化学的定量(SDS-PAGE法、標識コラーゲン法)、免疫学的定量(酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討)PDR法、ハイブリダイゼイション法などのようなアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。このような細胞接着分子としては、コラーゲン、インテグリン、フィプロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリー(例えば、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCA M1)、セレクチン、カドヘリンなどが挙げられるがそれに限定されない。このような細

胞接着分子の多くは、細胞への接着と同時に細胞間相互作用による細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達する。従って、本発明の組織片において用いられる接着因子としては、そのような細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達するものが好ましい。細胞活性化により、組織片としてある組織または臓器における損傷部位に適用された後に、そこに集合した細胞および/または組織もしくは臓器にある細胞の増殖を促すことができるからである。そのような補助シグナルを細胞内に伝達することができるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）PDR法、ハイブリダイゼイション法というアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。

【0138】

細胞接着分子としては、例えば、組織固着性の細胞系に広く知られる細胞接着分子としてカドヘリンがあり、カドヘリンは、本発明の好ましい実施形態において使用することができる。一方、非固着性の血液・免疫系の細胞では、細胞接着分子としては、例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー分子（CD 2、LFA-3、ICAM-1、CD2、CD4、CD8、ICM1、ICAM2、VCAM1など）；インテグリンファミリー分子（LFA-1、Mac-1、gp I I b I I I a、p 150、95、VLA 1、VLA 2、VLA 3、VLA 4、VLA 5、VLA 6など）；セレクチンファミリー分子（L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチンなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、そのような分子は、血液・免疫系の組織または臓器を処置するため特に有用であり得る。

【0139】

細胞接着分子は、非固着性の細胞が特定の組織で働くためにはその組織への接着が必要となる。その場合、恒常的に発現するセレクチン分子などによる一次接着、それに続いて活性化されるインテグリン分子などの二次接着によって細胞間の接着は段階的に強くなると考えられている。従って、本発明において用いられる細胞接着分子としては、そのような一次接着を媒介する因子、二次接着を媒介する因子、またはその両方が一緒に使用され得る。

【0140】

本明細書において「細胞接着性タンパク質」とは、上述のような細胞接着を媒介する機能を有するタンパク質をいう。従って、本明細書において細胞接着性タンパク質は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質（例えば、インテグリンなど）をも包含する。例えば、基質側のタンパク質を吸着した基質（ガラスやプラスチック）の上に無血清条件下で培養細胞を播種すると、レセプターであるインテグリンが細胞接着性タンパク質を認識し、細胞はその基質に接着する。細胞接着性蛋白質の活性部位はアミノ酸レベルで解明されており、RGD、YIGSRなどが知られている（これらを、総合してRGD配列とも呼ぶ）。従って、1つの好ましい実施形態において、本発明の組織片に含まれるタンパク質は、RGD、YIGSRなどのRGD配列を含むことが有利であり得る。通常、細胞接着性タンパク質は、細胞外マトリックス、培養細胞表面、血漿・血清・各種体液に存在する。その生体内での機能としては、細胞の細胞外マトリックスへの接着だけでなく、細胞の移動・増殖・形態調節・組織構築などが知られている。細胞作用とは別に、血液凝固・補体作用の調節機能を示すタンパク質もあり、本発明では、そのような機能を有するタンパク質もまた有用であり得る。そのような細胞接着性タンパク質としては、例えば、フィプロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0141】

本明細書において「RGD分子」とは、アミノ酸配列RGD（Arg-Gly-Asp）またはその機能的に同一な配列を含むタンパク質分子をいう。RGD分子は、細胞接着性蛋白質の細胞接着活性部位のアミノ酸配列として有用なアミノ酸配列であるRGDまたは機能的に等価な別のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。RGD配列は、フィプロネクチンの細胞接着部位として発見され、その後、I型コラーゲン、ラミン、ビトロネク

チン、フィブリノゲン、フォンヴィルブランド因子、エンタクチンなど多くの細胞接着性の活性を示す分子に見出された。化学合成したRGDペプチドを固相化すると細胞接着活性を示すことから、本発明における生体分子は、化学合成したRGD分子であってもよい。そのようなRGD分子としては、上述の天然に存在する分子のほかに、例えば、GRG DSPペプチドが挙げられるがそれに限定されない。RGD配列は細胞接着分子（かつ、レセプターでもある）であるインテグリン（例えば、フィプロネクチンのレセプター）によって認識されることから、RGDの機能的に等価な分子は、そのようなインテグリンを用いて相互作用を調べることによって同定することができる。

【0142】

本明細書において、「インテグリン」とは、細胞接着に関与するレセプターである膜貫通糖タンパク質をいう。インテグリンは、細胞表面に存在し、細胞が細胞外マトリクスに接着するときに機能する。血球系などでは細胞どうしの接着にも関与することが知られている。そのようなインテグリンとしては、例えば、フィプロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲンなどのレセプター、血小板のIIb/IIIa、マクロファージのMac-1、リンパ球のLFA-1、VLA-1～6、ショウジョウバエのPSAなどが挙げられるがそれに限定されない。通常、インテグリンは、分子量130kDa～210kDaの α 鎖と分子量95kDa～130kDaの β 鎖とが、非共有結合で1対1に会合したヘテロ二量体の構造をとる。 α 鎖としては、例えば、 α^1 、 α^2 、 α^3 、 α^4 、 α^5 、 α^6 、 α^L 、 α^M 、 α^X 、 α^{IIb} 、 α^V 、 α^E などがあるがそれに限定されない。 β 鎖としては、例えば β_1 、 β_2 、 β_3 、 β_4 、 β_5 、 β_6 、 β_7 などがあるがそれに限定されない。

【0143】

このようなヘテロ二量体としては、例えば、GpIIbIIIaのほかに、VLA-1、VLA-2、VLA-3、VLA-4、VLA-5、VLA-6、CD51/CD29、LFA-1、Mac-1、p150, 90、ビトロネクチンレセプター、 β^4 サブファミリー、 β^5 サブファミリー、 β^6 サブファミリー、LPAM-1、HML-1などがあるがそれに限定されない。通常、 α 鎖の細胞外ドメインに二価カチオン結合部位があり、 β 鎖の細胞外ドメインにシステインリッチ領域があり、 β 鎖の細胞内ドメインにチロシンリン酸化部位があることが多い。結合リガンド中の認識部位はRGD配列が多い。従って、インテグリンは、RGD分子であり得る。

【0144】

本明細書において「コラーゲン」とは、タンパク質の一種で、線維形成コラーゲンであり3本のポリペプチド鎖が3重螺旋を巻いた領域の総称であり、細胞生着、増殖の足場であり、組織骨格を形成するものをいう。コラーゲンは、動物の細胞外マトリクスの主成分である。コラーゲンもまた、RGD配列をもち、細胞接着活性を示すことが知られている。コラーゲンは、動物の全タンパク質中の約20～30%も含まれ、皮膚、腱、軟骨などに多量に含まれることが知られている。コラーゲン分子としては、I型～XII型が知られている。通常、分子一つが3本のポリペプチド鎖からなる三重らせん構造を取り、各鎖は α 鎖と呼ばれることが多い。コラーゲン分子では、1分子は1種類の α 鎖からなっていてもよく、別々の遺伝子にコードされた複数種の α 鎖からなっていてもよい。 α 鎖は、通常、 α_1 、 α_2 、 α_3 のように α の後に数字をつけてよび、さらにコラーゲンの型をつけて、 α_1 (I) などと称する。従って、本発明では、例えば、 $[\alpha_1$ (I) $_2$ α_2 (I)] (I型コラーゲン) のような天然に存在するコラーゲン分子のほか、天然に存在しないような組み合わせの三量体もまた私用され得る。コラーゲンの一次構造の大部分は、[Gly-X-Pro (またはヒドロキシプロリル)] $_n$ (Xは任意のアミノ酸残基) のアミノ酸配列からなる特徴をもつ。この構造は、3残基周期の左巻きらせん構造をとる。コラーゲンは通常、特殊なアミノ酸としてヒドロキシリジンを含む。コラーゲンは、糖タンパク質であるが、糖はヒドロキシリジンの水酸基に結合している。

【0145】

コラーゲンには、線維状で存在し集まって膠原線維をなす線維形成コラーゲンまたは間

質型コラーゲンという種類がある。そのような線維形成コラーゲンには、I型、II型、III型、V型、XI型コラーゲンがあり、本発明の好ましい実施形態において使用される。コラーゲンとしては、このほかに、短鎖コラーゲン（VIII型、X型など）、基底膜コラーゲン（IV型など）、FACITコラーゲン（IX型、XII型、XIV型、XVI型、XIX型など）、multiplexinsコラーゲン（XV型、XVII型など）、ミクロフィブリルコラーゲン（VI型など）、長鎖コラーゲン（VII型など）、膜結合型コラーゲン（XIII型、XVII型など）などが挙げられ、これらはすべて本発明において使用され得る。本明細書において「基底膜コラーゲン」とは、基底膜を構成する主要なコラーゲンをいう。IV型コラーゲンとしては、例えば、

本明細書において「I型コラーゲン」とは、 $[\alpha_1(I) \text{ } 2 \text{ } \alpha_2(I)]$ という構造を有するコラーゲンであり、 $\alpha_1(I)$ 鎖2本および $\alpha_2(I)$ 鎖のポリペプチド鎖のヘテロ3本鎖からなり、生体内のあらゆる組織に存在する組織骨格およびその機能的に等価な分子をいい、そのようなポリペプチドのアミノ酸配列としては、代表的には、Genbankのアクセション番号では、p02454、p02464が挙げられるがそれに限定されない。本明細書において、I型コラーゲンの機能的に等価な分子は、例えば、酵素抗体法、EIA法という方法により同定することができる。

【0146】

本明細書において「IV型コラーゲン」とは、基底膜コラーゲンであり、その分子は、7S、NC2、TH2、NC1の4つのドメインからなっており、N末端の7Sで4分子が重合し、C末端のNC1で2分子が重合することにより、網目状のネットワークを形成しているコラーゲンまたはその機能的に等価な分子をいい、そのようなポリペプチドのアミノ酸配列としては、代表的には、Genbankのアクセション番号p02462、p08572、U02520、D17391、P29400、U04845が挙げられるがそれに限定されない。本明細書において、IV型コラーゲンの機能的に等価な分子は、例えば、酵素抗体法、EIA法という方法により同定することができる。

【0147】

本明細書において「フィブロネクチン」は、当該分野において使用される意味と同じ意味で用いられ、従来接着因子の一つとして分類されるタンパク質である。

【0148】

本明細書において「ラミニン」とは、本明細書において「ラミニン」は、当該分野において使用される意味と同じ意味で用いられ、従来接着因子の一つとして分類されるタンパク質であり、細胞接着機能に注目されて研究が進められている分子である。ラミニンは基底膜を構成する高分子糖タンパク質で、その生理活性は細胞接着、伸展、細胞間信号伝達、正常細胞および癌細胞の増殖、細胞分化誘導、癌細胞転移など、多くの細胞機能に関与している。ラミニンは、Engelbreth-Holm-Swarmマウス腫瘍などから精製することができる。ラミニンを合成する場合は、 α 鎖、 β 鎖および γ 鎖からなり、種々の組み合わせにより20種類以上の組み合わせが知られている。本明細書では、どのラミニンであっても、支持体に結合する生体分子として使用することができる。どのラミニンであっても細胞接着に関与することが知られているからである。

【0149】

ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどは、BD (Becton and Dickinson and Company) から入手することができる。

【0150】

本明細書において「架橋可能な分子」とは、生体適合性材料と生体分子との間、タンパク質とタンパク質との間、タンパク質と核酸との間、またはDNAの二本鎖の間などで共有結合が起ることが可能な分子をいう。そのような架橋の形態としては、例えば、未熟架橋（シップ塩基型架橋）、成熟架橋（ピリジノリン）、老化架橋（ヒスチジノアラニン）などが挙げられるがそれに限定されない。このような架橋は、歯などの強固な構造が望ましいときに好ましくあり得る。

【0151】

本明細書において「支持体」とは、本発明の組織片または生体適合性組織片が構築される材料（好ましくは固体）をいう。支持体の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。従って、そのような支持体の材料としては、例えば、そのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコーン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、生分解性ポリマー（例えば、PGA、PLGA、PLA、PCLA）、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）、タンパク質などが挙げられるがそれらに限定されない。支持体は、複数の異なる材料から形成されていてもよい。そのような材料は、本発明の組織片において用いられる場合、生体適合性であることが好ましい。生体適合性であるかどうかは、例えば、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）等の拒絶反応をみるとことにより確認することができる。より好ましくは、本発明において使用される支持体は、生分解性であることが有利であり得る。本発明の組織片は、一定期間後はその中の成分が不要となることから、その一定期間後に分解して消えることが望ましいことがあるからである。そのような生分解性の材料としては、例えば、生分解性ポリマー（例えば、PGA、PLGA、PCLAなど）が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、本発明において使用される支持体は、生体の一部となることができる成分であってもよい。そのような成分としては、例えば、シリコーン、セラミック、タンパク質、脂質、核酸、糖（炭水化物）およびそれらの複合体が挙げられるがそれに限定されない。

【0152】

本明細書において「第一層」は、本発明の支持体において使用されるときは粗面を有することから、通常、移植片として使用されるときに内腔側に向けられるように用いられることが企図される。

【0153】

本明細書において「第二層」は、本発明の支持体において使用されるときは強度を生体内の衝撃に対して耐え得ることから、通常、移植片として使用されるときに、内腔側の反対側として使用されることが企図される。

【0154】

本明細書において「中間層」とは、支持体中の第二層と第一層との間の層として使用されることが企図される層をいう。中間層は、必ずしも第二層または第一層と密着する必要はないが、少なくとも1点において、第一層および第二層と接着されていることが通常必要である。封着が目的とされる場合は、第二層および第一層のいずれかの層と密着されることが好ましく、より好ましくは両方の層と密着されることが有利である。

【0155】

本明細書において、本発明の支持体は、第一層、第二層を含み、この両層は少なくとも1点において接着され、好ましくは、中間層を含み、この中間層によってその接着が達成され、必要に応じて、更なる層（第三層、第四層など）を含み得ることが理解される。

【0156】

本明細書において「粗面」とは、表面上に孔を有することをいい、好ましくは、細胞を収容するに充分なスペースを有する孔が配置される面をいう。このような孔は、細胞を収容することができることが望ましいことから、通常、少なくとも1μm程度の直径を有し、好ましくは少なくとも10μm程度の直径を有することが好ましい。より好ましくは、粗面に存在する孔は、少なくとも50μmの直径、さらに好ましくは少なくとも100μmの直径を有することが有利である。このような粗面を有することによって、本発明の支持体の第一層は、細胞の足場として機能することになる。粗面を有する層としては、例えば、繩物があるがそれに限定されない。

【0157】

本明細書において「生体内衝撃に耐え得る強度」とは、移植された後に移植された場所

での通常の生体内の衝撃に耐え得ることをいい、移植部位によって変動するが、当業者はその移植部位が決定されると、この強度を即座に理解することができ、決定することができる。そのような強度は、引っ張り強度（代表的単位はN（力）、MPa（応力））、弾性率（ヤング率；代表的単位はN（力）、MPa（応力））、伸び（代表的単位は%）などの尺度によって表現することができる。このような強度を有する層としては、例えば、織物があるがそれに限定されない。

【0158】

本明細書において引っ張り強度、弾性率、伸びなどは、引張り試験によって確認することができる。本明細書において使用される例示的な引張り試験は、以下のとおりである。

【0159】

本明細書において組織片の引っ張り強度は、引張試験機（TENSILLON ORIENTEC）で強度測定することができる。具体的には、幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷および弾性率を測定することができる。代表的には、移植可能な組織片は、その強度が少なくとも約10N以上であり得、通常約25N以上であり得、好ましくは約50N以上であり、より好ましくは約75N以上であり得る。通常の臓器移植に使用する場合には、約50N以上であることが好ましい。破壊されないからである。上述のプロトコルにおいて、伸びの測定は、引張り刺激の前後での各方向の長さを測定し、引張り後の長さを引張り前の長さで割り100をかけることによって得ることができる。応力で表示する場合、本発明の支持体は、通常、少なくとも1MPaの引張り強度を有し、好ましくは少なくとも5MPaの引張り強度を有し、より好ましくは少なくとも10MPaの引張り強度を有する。弾性率でみると、本発明の支持体は、通常1MPaの弾性率を有し、好ましくは少なくとも10MPaの弾性率を有し、より好ましくは少なくとも20MPaの弾性率を有する。伸びに関しては、本発明の支持体は、通常少なくとも105%、好ましくは110%の伸びを有する。伸びは、縦方向と横方向とを両方測定する。この両方の伸びにはばらつきがないほうが好ましいがそれに限定されない。強度、弾性率などは、N（力）で表示してもよく、MPa（応力）で表示してもよい。そのような場合、1N/測定mm²=1MPaという公式によって換算することができる。

【0160】

本明細書において「封着」とは、本発明の支持体において表面と裏面との間の生体分子の行き来が実質的に不可能になる程度に接着されていることをいう。このような封着の度合いは、水漏れ率によって表現することができる。封着することができる層としては、例えば、合成生体分解性ポリマーが挙げられるがそれらに限定されない。

【0161】

本明細書において水漏れ率は、対象となる支持体を水平に置き、その上に10mlの水を垂らし、60秒間でどのくらい水が漏れるかを測定し、漏れた量自体、または漏れた量を10mlで割ることによって得られた値を水漏れ率として表示する。

【0162】

本明細書においてある層と別の層との間の接着強度は、引張り試験によって測定することができる。具体的には、上述の試験において、以下のようにすることによって測定することができる。

【0163】

引っ張り試験において、接着強度を測るには、具体的には、20mm長さの第一層と20mm長さの第二層とを10mm分好ましくは接着層（中間層）を設けて接着し、長さ30mmの短冊状支持体を製作し、長手軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点における負荷を接着強度をして採用した。その測定の模式図は図28に示す。接着強度の測定については、Otani et al., Biomaterials 17(1996) 1387-1391を参照のこと。

【0164】

本明細書において「縫物」（knit）とは、材料（通常糸状のものが使用される）を、針またはワイヤーなどの手段を用いて材料のループを組み合わせる（順次つなげていく

)ことによって作製された生地をいう。縫物は、生地中にスペースがあることが望ましい場合に用いられる。縫物は、このように輪をつなげていくことから、隙間が開き、細胞を収容するに十分なスペースを作製することができる。しかし、縫物だけでは、隙間が多く液体(例えば、血液のような体液)が漏れてしまうという欠点がある。

【0165】

本明細書において「織物」(woven)とは、材料(通常糸状のものが使用される)を、代表的には縦部分(縦糸；径部分、径糸ともいう)と横部分(横糸；緯糸ともいう)とを組み合わせることによって作製された生地をいう。織物は、隙間がほとんどないことから、液体(例えば、血液)の漏れを防止することが望ましい場合に用いられる。しかし、織物だけでは縫合したときに端がほつれるという問題点がある。

【0166】

本明細書において「細胞が入り込むに充分なスペース」とは、支持体または層について言及されるとき、細胞がその支持体または層に少なくとも付着することができ、好ましくは細胞が収容されるに充分なスペースをいう。そのようなスペースは、例えば、少なくとも $10\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは少なくとも $50\text{ }\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは少なくとも $100\text{ }\mu\text{m}$ の直径であらわすことができる。細胞が入り込むに充分なスペースは、細胞が付着することができる限り、上記下限の数値よりも小さな直径のスペースであってもよい。好ましくは、このようなスペースは、液体が漏れにくい程度の大きさであることが好ましい。したがって、例えば、上限として直径 $200\text{ }\mu\text{m}$ などがあげられるがそれらに限定されない。

【0167】

本明細書において「生体適合性」とは、毒性、免疫反応、損傷などを生じることなく生体組織または臓器と適合する性質をいう。本発明において生体適合性とは、ある物質について用いられる場合、その物質が、そのまま使用される場合に生体適合性を有する場合を当然に含むが、上述のような毒性、免疫反応または損傷を必要に応じて防御する手段(例えば、免疫抑制剤の投与など)を講じることができる(すなわち、その物質自体を使用する場合には毒性、免疫反応または損傷を生じるとしても、防御手段とともに用いる場合にそのような毒性、免疫反応、損傷などが顕著に減少または実質的に消失する)限り、そのような物質もまた、生体適合性であるといえる。単独で用いる場合にせいた器適合性とはいえない場合は、上述の防御手段を本発明の組織片に含むことが好ましい。本発明において使用され得る生体適合性材料としては、例えば、PGA、PLA、PCLA、PLGA、ポリL乳酸、ポリブチレート、シリコーン、生分解性リン酸カルシウム、多孔質4フッ化エチレン樹脂、ポリプロピレン、アミロース、セルロース、合成DNA、ポリエステル類等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0168】

本明細書において、「生分解性材料」とは、天然に分解するかまたは生体内での代謝もしくは微生物によって分解される任意の材料をいう。通常生分解性材料としては、生分解性ポリマーが使用される。

【0169】

本明細書において「生分解性ポリマー」または「生分解性高分子」とは、互換可能に使用され、天然に分解するか、または生体内での代謝もしくは微生物の作用により分解される高分子をいう。このような生分解性ポリマーは、通常、加水分解により、水、二酸化炭素、メタンなどに分解される。このような生分解性ポリマーには、天然および合成高分子がある。天然高分子の例としては、例えば、コラーゲン、デンプンなどのタンパク質、多糖類が挙げられ、合成高分子の例としては、ポリグリコール酸、ポリL乳酸、ポリエチレンスルシナートなどの脂肪族ポリエステルが挙げられるがそれらに限定されない。このような生分解性ポリマーは、外科手術用の吸収性縫合糸、徐放性薬剤の基材、骨接合用材料として用いられており、そのような用途で使用されるようなものであれば、どのようなポリマーであっても本発明において使用することができる。生分解性ポリマーとしては、例えば、ポリペプチド、ポリサッカリド、核酸、PGA、PLGA、ポリL乳酸、ポリブチレート、リンゴ酸共重合体、ラクチドーカプロラクトン共重合体、ポリ-ε-カプロラク

トン、ポリ- β -ヒドロキシカルボン酸、ポリジオキサノーン、ポリ-1,4-ジオキセパン-7-オン、グリコリド-トリメチレンカーボネート共重合体、ポリセバシン酸無水物、ポリ- ω -（カルボキシフェノキシ）アルキルカルボン酸無水物、ポリ-1,3-ジオキサン-2-オン、ポリデプシペプチド、ポリ- α -シアノアクリル酸エチル、ポリホスファゼン、ヒドロキシアパタイトが挙げられるがそれらに限定されない。そのような生分解性ポリマーとしては、好ましくは、生体内で一定時間は定着し、その後分解または吸収される性質をもつことが有利であり得る。そのような分解は、代謝に用いられる酵素系の作用により進行する特異的分解機構によるものと、酵素などがなくても体液との接触により自然分解する非特異的分解機構とがあるが、本発明においては、いずれかまたは両方の機構により分解されるものであっても使用することができる。好ましくは、そのような生分解性ポリマーは、それ自体が無毒および/または免疫原性がないことに加えて、その分解（代謝）中間産物、分解（代謝）産物などもまた、無毒および/または免疫原性がないことが好ましい。

【0170】

本明細書において「PGA」とは、ポリグリコール酸の略称であり、グリコール酸の重合体である。グリコール酸は、 $\text{CH}_2(\text{OH})\text{COOH}$ で表される。PGAはポリグリコリドとも呼ばれ得る。ポリグリコール酸は、織物を作製するのに適していることから、本発明では、代表的には、粗面を有する第一層のために使用され得るがそれに限定されない。

【0171】

本明細書において「PLA」とは、ポリL乳酸の略称であり、L乳酸の重合体である。グリコール酸は、 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される。PLAはポリラクチドとも呼ばれ得る。ポリL乳酸は、織物を作製するのに適していることから、本発明では、生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層のために使用され得るがそれに限定されない。

【0172】

PGAおよびPLAは、当該分野において周知の方法により合成することができる。そのような方法としては、例えば、グリコール酸または乳酸の加熱脱水重合、 α -ハロ酢酸、 α -ハロプロピオン酸の脱ハロゲン化水素などの縮重合などにより合成することができる。好ましくは、重合度を上昇させるために、得られたオリゴマーを、いったん減圧下に加熱分解して環状二量体であるグリコリドまたはラクチドを得、これらを開環重合することにより目的の重合度の高分子を合成することができる（例えば、H. R. Kricheldorf, et al. Makromol. Chem. Suppl. 12, 25 (1985) を参照のこと）。この場合、重合後に残る触媒が生体毒とならないことが好ましい。そのような触媒としては、例えば、オクチル酸スズなどが挙げられるがそれに限定されず、当該分野において用いられる生体毒を生じないか低生体毒性であるものであれば、どのようなものでも用いることができる。

【0173】

本明細書において「PLGA」とは、ポリL乳酸ポリグリコール酸共重合体の略称であり、グリコール酸と乳酸との共重合体である。乳酸は、 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される。PLGAは、ポリグラクチン（polyglactin）と呼ばれ得る（例えば、グリコリド/ラクチド=9/1）。

【0174】

そのようなPLGAは、当該分野において周知の手法により合成することができる。PLGAは、含まれるグリコール酸および乳酸の割合によって、その性質を劇的に変動させることができる。例えば、生体内の吸収半減期は、R. A. Miller et al. J. Biomed. Res. 11, 719 (1977)において記載されるような関係式を利用して、数日～数ヶ月の範囲内で変動させることができる。2～3週間以内の生体内半減期が望ましい場合は、通常、PLAとPGAとの割合を20:80～80:20に探ることが好ましい。これに対し、1ヶ月以上の生体内半減期が望ましい場合は、通常、PLAとPGAとの割合を20:80～0:100とするか、あるいは80:20～100

：0とすることが好ましい。従って、長い吸収半減期（例えば、数ヶ月）が望ましい場合は、PLAまたはPGAを使用することが好ましい。PLGAは、PLAとPGAとの割合を変化させることにより纖維強度の半減期も変動させることができる。纖維強度の半減期は、通常、PGAおよびPLAで2～3週間であり、PLAで3～6ヶ月であることから、纖維強度の半減期が長いものが望ましい場合は、PLGAにおいてPLAの割合を増加させるか、あるいはPLA自体を使用することが好ましい。

【0175】

PLGAの合成は、当該分野において周知であり、上述のPLAおよびPGAの合成において生成されるグリコリドおよびラクチドを混合物として用いて、開環共重合させることによって達成される。このようにして得られたPLGAは、通常グリコリド：ラクチドの割合が25：75～75：20までではガラス状の高分子であるが、グリコリド：ラクチドの割合が25：75～0：100では、ポリL-乳酸に類似する結晶性の高分子となり、グリコリド：ラクチドが75：25～100：0では、ポリグリコール酸に類似する結晶性高分子となる。従って、当業者は、これらの組成を変動させることによって、加水分解性、材料強度を変動させることができる。

【0176】

本明細書において「メッシュ状」とは、組織片などの形状についていう場合、網目状のものをいう。メッシュ状の組織片は、当該分野において周知の方法により生産することができる。そのようなメッシュ状の組織片のメッシュの細かい形状もまた、当該分野において周知の方法を用いて調製することができる。そのようなメッシュ状組織片としては、例えば、市販のもの（VICRYL KNITTED MESH (ETHICON製)）を使用することができる。

【0177】

本明細書において「スポンジ状」とは、組織片などの形状についていう場合、多孔質のものをいう。そのようなスポンジ状の組織片は、当該分野において周知の方法を用いて調製することができる。そのようなスポンジ状組織片としては、例えば、市販のもの（VICRYL WOVEN MESH (ETHICON製)）を使用することができる。

【0178】

本明細書において「コーティング」とは、支持体などにおいて使用される場合、その支持体がある別の物質によって覆われる状態をいう。従って、コーティングは、コーティングがされる支持体と相互作用をすることができる物質を用いて行うことができる。コーティングによって、支持体は、その支持体自体の物質が外界（例えば、空気）と触れなくなるように処理されていてもよいが、支持体とコーティング物質とがある程度相互作用する状態を保持するのであれば、外界と触れなくなるほどにコーティングされていなくてもよい。そのようなコーティングの程度は、任意であり、当業者は、当該分野において周知の技法を用いて調整することができる。そのようなコーティング技術は、例えば、高分子機能材料シリーズ医療機能材料 共立出版株式会社に記載されている。

【0179】

本明細書において「ポリサッカリド」、「多糖」、「オリゴサッカリド」、「糖」および「炭水化物」は、本明細書において互換可能に使用され、单糖がグリコシド結合によって脱水縮合した高分子化合物をいう。「单糖」または「モノサッカリド」とは、これより簡単な分子に加水分解されず、一般式 $C_n H_{2n} O_n$ で表されるものをいう。ここで、 $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ および10であるものを、それぞれジオース、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトース、ノノースおよびデコースという。一般に鎖式多価アルコールのアルデヒドまたはケトンに相当するもので、前者をアルドース、後者をケトースという。このようなポリサッカリドは、単独でまたは複合体もしくは混合物として本発明において支持体として使用され得る。

【0180】

本明細書において「脂質」とは、生体を構成する物質のうち水に溶けにくく、有機溶媒に溶けやすい物質群をいう。脂質には、多種類の有機化合物が含まれる。通常、脂質には

、長鎖脂肪酸とその誘導体または類似体が含まれるが、本明細書においては、ステロイド、カロテノイド、テルペノイド、イソプレノイド、脂溶性ビタミンなどの生体内にある水不溶で有機溶媒に易溶の有機化合物群もまた含まれる。脂質としては、例えば、1) 単純脂質（脂肪酸と各種アルコールとのエステルで中性脂質ともいう。例えば、油脂（トリアシルグリセロール）、蠟（ワックス、高級アルコールの脂肪酸エステル）、ステロールエステル、ビタミンの脂肪酸エステルなど）；2) 複合脂質（脂肪酸とアルコールのほかにリン酸、糖、硫酸、アミンなど極性基をもつ化合物で、グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、C-P結合をもつ脂質、硫脂質などが含まれる）；3) 誘導脂質（単純脂質および複合脂質の加水分解によって生成する化合物のうち脂溶性のものをさし、脂肪酸、高級アルコール、脂溶性ビタミン、ステロイド、炭化水素などが含まれる）が挙げられるがそれに限定されない。本発明においては、細胞を集合させる機能を阻害しない限り、どのような脂質でも支持体として用いることができる。

【0181】

本明細書において「複合体」とは、物質について使用されるとき、複数の種類の物質を含む（好ましくはそれら複数の成分が相互作用している）分子をいう。そのような複合体としては、例えば、糖タンパク質、糖脂質などが挙げられるがそれに限定されない。

【0182】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

【0183】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

【0184】

本発明において使用される生体分子は、生体から採取され得るほか、当業者に公知の方法によつて化学的に合成され得る。例えば、タンパク質であれば、自動固相ペプチド合成機を用いた合成方法は、以下により記載される：Stewart, J. M. et al. (1984). Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co. ; Grant, G. A. (1992). Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman; Bodanszky, M. (1993). Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag; Bodanszky, M. et al. (1994). The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag; Fields, G. B. (1997). Phase Peptide Synthesis, Academic Press; Pennington, M. W. et al. (1994). Peptide Synthesis Protocols, Humana Press; Fields, G. B. (1997). Solid-Phase Peptide Synthesis, Academic Press。その他の分子もまた、当該分野において周知の技術を用いて合成することができる。

【0185】

本明細書において生体分子（例えば、コラーゲン、ラミニンなどをコードする核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、比較可能な配列を有する場合、2以上の配列の

、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの配列の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の配列が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリングエントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの配列を直接比較する場合、その配列間で配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、生体分子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。本発明では、このように同一性が高いものまたは類似性が高いものもまた、有用であり得る。

【0186】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

【0187】

本明細書において、「アミノ酸」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。

【0188】

用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。

【0189】

用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラーニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラーフルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

【0190】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

【0191】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応す

るオルソログにおける同様の部分であり得る。

【0192】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。例えば、マウスコラーゲンに対応する遺伝子は、ヒトコラーゲンである。

【0193】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがn）に対して、1～n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本発明では、生体分子としてポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどが使用される場合、所望の目的（例えば、細胞誘引効果など）が達成される限り、このようなフラグメントもまた、全長のものと同様に使用され得ることが理解される。

【0194】

本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

【0195】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が含まれる。例えば、ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

【0196】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換

された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzlerら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

【0197】

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。このような改変体もまた、所望の目的を達成することができる限り、本発明の生体分子として使用することができる。

【0198】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (Kyte. J および Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1) : 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など）との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5) である。

【0199】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらにより好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0±1)；グルタミン酸 (+3.0±1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5±1)；アラ

ニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；およびトリプトファン（-3.4）。アミノ酸が同様の親水性指数を有しあつ依然として生物学的等価体を与える別ものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらにより好ましい。

【0200】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、±2以内のもの同士、好ましくは±1以内のもの同士、より好ましくは±0.5以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。このような改変体もまた、所望の目的を達成することができる限り、本発明の生体分子として使用することができる。

【0201】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（truncated）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。このような改変体もまた、所望の目的を達成することができる限り、本発明の生体分子として使用することができる。対立遺伝子（allele）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ（homolog）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ（ortholog）」とは、オルソロガス遺伝子（orthologous gene）ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子および β ヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種においてもとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

【0202】

「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。

【0203】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

【0204】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本発明の方法においては、どのような細胞でも対象とされ得る。本明細書において細胞数は、光学顕微鏡を通じて計数することができる。光学顕微鏡を通じて計数する場合は、核の数を数えることにより計数を行う。当該組織を組織切片スライスとし、ヘマトキシリニーエオシン（HE）染色を行うことにより細胞外マトリクスおよび細胞に由来する核を色素によって染め分ける。この組織切片を光学顕微鏡にて検鏡し、特定の面積（例えば、200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ）あたりの核の数を細胞数と見積って計数することができる。

【0205】

細胞は、石灰化および免疫反応惹起の原因となる。従って、組織または臓器への移植のためには、自己由来以外の細胞はできるだけ除去されるべきであり、本発明においては、含まないことが好ましくあり得る。本発明の組織片において細胞を含む場合は、自己由来の細胞のような免疫拒絶の問題が通常生じないと考えられる細胞を用いることが好ましい。

【0206】

本発明で細胞が用いられる場合、そのような細胞はどの生物（例えば、脊椎動物、無脊椎動物）由来の細胞でもよい。好ましくは、脊椎動物由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類由来の細胞が用いられる。ヒトへの移植に用いられる場合、最も好ましくはヒト（特に、自己または遺伝子系の類似もしくは同一である個体）由来の細胞が用いられる。

【0207】

本明細書において「細胞の置換」とは、組織内で、もとあった細胞または何もなかった場所に代わり、別の細胞が侵入し置き換わることをいい、細胞の浸潤ともいう。本発明の組織片を用いると、細胞の置換は、移植の宿主内の細胞によって行われる。本発明の組織片を用いると、自己由来の細胞などは全くないにもかかわらず、移植後に宿主由来の細胞が浸潤し置換することが認められた。このような事象はこれまで開発された移植片などのグラフトでは決して起こらなかったことであり、このこと自体、本発明の予想外の極めて優れた効果を示すものといえる。細胞の置換は、当該分野において公知の手法を用いて確認することができ、例えば、フォンビルブランド因子、 α -SMA、弾性組織についてのファン・ギーンソンなどのように、自己細胞の増殖を確認するマーカーを用いて判定することができる。そのような細胞の置換を確認する手法は、例えば、病理組織染色ハンドブック 医学書院に記載されている。

【0208】

本明細書において「組織」（tissue）とは、生物において、同一の機能・形態をもつ細胞集団をいう。多細胞生物では、通常それを構成する細胞が分化し、機能が専能化し、分業化がおこる。従って細胞の単なる集合体であり得ず、ある機能と構造を備えた有機的細胞集団、社会的細胞集団としての組織が構成されることになる。組織としては、外

皮組織、結合組織、筋組織、神経組織などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明が対象とする組織は、生物のどの臓器または器官由来の組織でもよい。本発明の好ましい実施形態では、本発明の組織片が移植される対象組織としては、血管、血管様組織、心臓弁、心膜、硬膜、心臓、心臓内、皮膚、骨、軟部組織、気管などの組織が挙げられるがそれらに限定されない。本発明で用いられる支持体に使用される分子は、好ましくは生体適合性であることから、原理的にはどの器官由来の組織でも本発明の移植対象とすることができる。従って、本発明が対象とする組織は、生物のどの臓器または器官由来でもよく、また、本発明が対象とする組織は、どのような種類の生物由来であり得る。本発明が対象とする生物としては、脊椎動物または無脊椎動物が挙げられる。好ましくは、本発明が対象とする生物は、哺乳動物（例えば、霊長類、齧歯類など）である。より好ましくは、本発明が対象とする生物は、霊長類である。最も好ましくは、本発明はヒトを対象とする。

【0209】

本明細書において「組織片」（explant）とは、組織または臓器の一部（もしくは全部）または組織または臓器の一部（もしくは全部）となり得る物質をいう。組織片は、人工的に合成することもでき、または天然に存在する材料を使用してもよく、あるいは、両者を使用してもよい。組織片は、通常、その形状を維持するための支持体を含む。本明細書において、本発明の支持体は、それ自体のみで、または生体分子と組み合わせて組織片として使用することができる。

【0210】

本明細書において「組織片」は、「移植片」、「グラフト」および「組織グラフト」と交換可能に用いられ得る。組織片は、通常、身体の特定部位に挿入されるべき同種または異種の組織または細胞群であって、身体への挿入後その一部となる。従来の移植片としては、例えば、臓器または臓器の一部、血管、血管様組織、皮片、心臓弁、心膜、硬膜、角膜骨片、歯などが使用されてきた。従って、移植片には、ある部分の欠損部に差し込んで欠損を補うために用いられるものすべてが含まれる。移植片としては、そのドナー（donor）の種類によって、自己（自家）移植片（autograft）、同種移植片（同種異系移植片）（allograft）、異種移植片が挙げられるがそれらに限定されない。

【0211】

本明細書において「膜状組織」とは、「平面状組織」ともいい、膜状の組織をいう。膜状組織には、心膜、硬膜、角膜などの器官の組織が挙げられる。

【0212】

本明細書において「管状組織」とは、管状の組織をいう。管状組織には、血管などの器官の組織が挙げられる。

【0213】

本明細書において「臓器」または「器官」（organ）とは、互換的に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする器官は、虚血性の器官（心筋梗塞を起こした心臓、虚血を起こした骨格筋など）が挙げられる。1つの好ましい実施形態では、本発明が対象とする臓器は、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸、脳、骨、気管、皮膚、血管、軟部組織である。より好ましい実施形態では、本発明が対象とする臓器は、心臓（心臓弁）、骨、皮膚、血管などである。

【0214】

本明細書において「免疫反応」とは、移植片と宿主との間の免疫対応による反応をいい、例えば、超急性拒絶反応（移植後数分以内）（ β -Galなどの抗体による免疫反応）、急性拒絶反応（移植後約7～21日の細胞性免疫による反応）、慢性拒絶反応（3カ月以降の細胞性免疫による拒絶反応）などが挙げられる。

【0215】

本明細書において免疫反応を惹起するかどうかは、HE染色などを含む染色、免疫染色、組織切片の検鏡によって、移植組織中の細胞（免疫系）浸潤について、その種、数などの病理組織学的検討を行うことにより判定することができる。

【0216】

本明細書において「石灰化」とは、生物体で石灰質が沈着することをいう。生体内の組織または臓器が石灰化すると、通常その組織または臓器の正常な機能が損なわれることから、石灰化は起こらないほうが好ましい。従って、移植治療では、石灰化を回避する処置をとることが従来より望まれていた。本発明の組織片を用いると、石灰化の問題は回避される。

【0217】

本明細書において生体内で「石灰化する」かどうかは、カルシウム濃度を測定することによって判定することができ、移植組織を取り出し、酸処理などにより組織切片を溶解させ、その溶液を原子吸光度などの微量元素定量装置により測定し、定量することができる。

【0218】

本明細書において「生体内」または「インビボ」（in vivo）とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする組織または器官が配置されるべき位置をいう。

【0219】

本明細書において「インビトロ」（in vitro）とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」（例えば、試験管内に）摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0220】

本明細書において「エキソビボ」（ex vivo）とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より抽出し、インビトロで治療遺伝子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソビボという。

【0221】

本明細書において自己移植片または自家移植片とは、ある個体についていうとき、その個体に由来する移植片をいう。本明細書において自己移植片というときは、広義には遺伝的に同じ他個体（例えば一卵性双生児）からの移植片をも含み得る。

【0222】

本明細書において同種移植片（同種異系移植片）とは、同種であっても遺伝的には異なる他個体から移植される移植片をいう。遺伝的に異なることから、同種異系移植片は、移植された個体（レシピエント）において免疫反応を惹起し得る。そのような移植片の例としては、親由来の移植片などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0223】

本明細書において異種移植片とは、異種個体から移植される移植片をいう。従って、例えば、ヒトがレシピエントである場合、ブタからの移植片は異種移植片という。

【0224】

本明細書において「レシピエント」（受容者）とは、移植片または移植体を受け取る個体といい、「宿主」とも呼ばれる。これに対し、移植片または移植体を提供する個体は、「ドナー」（供与者）という。

【0225】

本明細書において「被験体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」といわれる。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

【0226】

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、およ

び希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、增量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または農学的もしくは薬学的アジュバントなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0227】

(好ましい実施形態の説明)

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参照して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

【0228】

(生体分子付着組織片)

1つの局面において、本発明は、生体適合性組織片を提供する。この生体適合性組織片は、A) 生体分子；およびB) 支持体を含む。この生体適合性組織片は、生体分子と支持体との構成のみで実際に移植治療に使用され得るだけでなく、移植後に、自己化を起こすことが予想外に発見された。従来は、移植片としては、生体由来の自己増殖性を有するもの（例えば、組織の一部、臓器そのもの）を利用するか、あるいは人工物を使用した場合であっても、その人工物に生体由来の自己増殖性を有するもの（例えば、細胞）を付着させる必要があると考えられていた。

【0229】

本発明では、実施例などでも示すように、自己増殖性を有するもの（例えば、細胞）を全く含まない組織片を用いて移植処置をしても、その処置の部位において自己化（すなわち、自己またはそれと等価な細胞が集合し、増殖すること）が起こることが明らかになった。従って、本発明の組織片は、従来不可能とされていた組織または臓器を治療するのにも使用することができる。なぜなら、本発明の組織片に含まれる支持体は、どのような形状にも変更することができるからである。

【0230】

理論に束縛されないが、本発明の組織片が宿主内の臓器または組織の一部（代表的には損傷部位あるいは強化が望まれる部位）に移植されると、組織片に含まれる生体分子（例えば、コラーゲンなど）の働きにより、宿主内の細胞（特に、その臓器または組織の一部となる（例えば、増殖または分化）ことができるもの）がその組織片の周辺に集合し、場合によって増殖することにより、その臓器または組織の損傷部位または強化部位が修復または強化される。

【0231】

従って、そのような生体分子としては、宿主内の細胞を直接または間接的に集合させる（例えば、接着あるいは、接着を媒介する分子の誘導など）ことができる分子であれば、どのような生体分子であっても使用することができる。従って、このような生体分子は、生体に由来するものであってもよいが、上述の機能を有する限り、合成により生産することもでき、天然に存在するものであっても天然に存在しないものであってもよい。好ましくは、天然に存在するものであって、その宿主に害を与えないことが判明している物質（例えば、厚生労働省から医薬品の成分として使用することが認められている物質、例えば、日本薬局方収載品など）を用いることが有利であり得る。あるいは、そのような生体分子は、その宿主に害を与えないことが別途確認されたものであってもよい。代表的には、そのような生体分子は、タンパク質を含む。

【0232】

1つの実施形態において、本発明において使用される生体分子は、細胞生理活性物質を含み得る。そのような細胞生理活性物質としては、例えば、HGF、血小板由来増殖因子（PDGF）、表皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）白血病抑制因子（LIF）、c-kitリガンド（SCF）などが挙げられるがそれに限定されない。

【0233】

好ましい実施形態では、本発明において用いられる生体分子は、細胞接着分子を含み得る。細胞接着分子は、細胞と細胞または基質との接着を媒介することから、移植されたときに、その場所に宿主内の細胞を呼び寄せる機能を有すると考えられることから、好ましい実施形態と考えられる。しかし、従来は、このような細胞接着分子が直接そのような移植片として使用されるかどうかは不明であり、むしろ、細胞などの自己増殖性のものを含ませることが必須と考えられていた (Raf Sodian et al. Ann Thorac Surgery 2000; 70; 140-44; Sodian R, Lemke T, Fritzsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Popotov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue Eng 2002 Oct; 8 (5): 863-70; Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, Eid K, Maurus C, Melnitchouk S, Grunenfelder J, Turina MI., Eur J Cardiothoracic Surg. 2002 Jun; 21 (6): 1055-60などを参照) ことから、本発明の移植片がもたらした効果は予想外といえる。

【0234】

そのような細胞接着分子としては、例えば、コラーゲン、ICAM、NCAM、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニン、インテグリン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリーなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0235】

別の好ましい実施形態において、本発明において用いられる生体分子は、細胞外マトリクスを含む。そのような細胞外マトリクスもまた、細胞を集合させる活性を有することが知られることから、本発明における好ましい実施形態と考えられる。しかし、従来は、このような細胞外マトリクスが直接そのような移植片として使用されるかどうかは不明であり、むしろ、細胞などの自己増殖性のものを含ませることが必須と考えられていたことに鑑みると、このような細胞外マトリクスを直接移植片の主要成分として用いることができるという知見は、予想外の効果といえる。

【0236】

そのような細胞外マトリクスとしては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ラミニンなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0237】

別の好ましい実施形態において、本発明において用いられる生体分子は、細胞接着性タンパク質を含む。そのような細胞接着性タンパク質もまた、細胞を集合させる活性を有することが知られることから、本発明における好ましい実施形態と考えられる。しかし、従来は、このような細胞接着性タンパク質が直接そのような移植片として使用されるかどうかは不明であり、むしろ、細胞などの自己増殖性のものを含ませることが必須と考えられていたことに鑑みると、このような細胞接着性タンパク質を直接移植片の主要成分として用いることができるという知見は、予想外の効果といえる。

【0238】

そのような細胞接着性タンパク質としては、例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ICAM、NCAM、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニン、インテグリン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリーなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0239】

1つの好ましい実施形態において、本発明において用いられる生体分子は、RGD分子を含む。そのようなRGD分子もまた、細胞を接着させる活性を有することが知られることから、本発明における好ましい実施形態と考えられる。しかし、従来は、このようなRGD分子が直接そのような移植片の主要成分として使用されるかどうかは不明であり、むしろ、細胞などの自己増殖性のものを含ませることが必須と考えられていたことに鑑みる

と、このようなRGD分子を直接移植片の主要成分として用いることができるという知見は、予想外の効果といえる。

【0240】

そのようなRGD分子としては、例えば、コラーゲン（I型など）、ラミニン、フィブロネクチン、ICAM、NCAM、ビトロネクチン、フォンヴィルブランド因子、エンタクチンなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0241】

より好ましい実施形態では、本発明において用いられる生体分子は、コラーゲンまたはラミニンを含む。コラーゲンおよびラミニンもまた、細胞を接着させる活性を有することが知られることから、本発明における好ましい実施形態と考えられる。しかし、従来は、このようなコラーゲンおよびラミニンは、補助成分として使用されており、直接そのような移植片の主要成分として使用されるかどうかは不明であり、むしろ、細胞などの自己増殖性のものを含ませることが必須と考えられていたことに鑑みると、このようなコラーゲンおよびラミニンを直接移植片の主要成分として用いることができるという知見は、予想外の効果といえる。

【0242】

より好ましくは、このコラーゲンは、線維形成コラーゲンまたは基底膜コラーゲンであり得る。さらに好ましくは、本発明において用いられる生体分子は、この線維形成コラーゲンおよび基底膜コラーゲンを含む。線維形成コラーゲンおよび基底膜コラーゲンの両方を含むことにより、組織片の移植後の自己化が最もよく促進された。これは、理論に束縛されないが、細胞の集合および接着活性がこの組み合わせにより最も最適化されるからであると考えられる。

【0243】

さらに好ましくは、このコラーゲンは、I型またはIV型のコラーゲンであることが有利であり得る。I型およびIV型が有利であるのは、血管内皮、平滑筋細胞、心筋細胞、それらの前駆細胞（幹細胞）が生着、増殖の足場としてより有効であるという原因が挙げられるがそれに限定されない。

【0244】

もっとも好ましい実施形態において、本発明の生体分子は、コラーゲンI型およびIV型の両方を含む。コラーゲンI型およびコラーゲンIV型の両方と一緒に含むことにより、組織片の移植後の自己化が最もよく促進された。これは、理論に束縛されないが、細胞の集合および接着活性がこの組み合わせにより最も最適化されるからである。

【0245】

別の実施形態において、本発明に用いられる支持体は、膜状であり得る。膜状の支持体を用いた組織片は、膜状の組織または臓器への移植に適切であり得る。そのような膜状の組織または臓器としては、例えば、皮膚、角膜、硬膜、大型の臓器（例えば、肝臓、心臓など）の一部などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0246】

別の実施形態において、本発明に用いられる支持体は、管状であり得る。管状の支持体を用いた組織片は、管状の組織または臓器への移植に適切であり得る。そのような管状の組織または臓器としては、例えば、血管、リンパ管などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0247】

別の実施形態において、本発明に用いられる支持体は、弁状であり得る。管状の支持体を用いた組織片は、弁状の組織または臓器への移植に適切であり得る。そのような弁状の組織または臓器としては、例えば、心臓弁などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0248】

好ましい実施形態において、本発明の支持体は、生分解性ポリマーを含むことが有利であり得る。より好ましくは、本発明の支持体は、生分解性ポリマーから構成されることが

より有利であり得る。支持体が生分解性ポリマーを含むかまたは生分解性ポリマーから構成されることにより、一定期間の後には、本発明の組織片は自己の細胞のみから構成されるようになり、移植の対象となった臓器または組織が自己のものと区別がほとんどできなくなるからである。本発明において使用されることが好ましい生分解性ポリマーとしては、PLA、PGA、PLGA、ポリカプロラクタム（PCLA）などが挙げられるがそれに限定されない。

【0249】

好ましい実施形態では、本発明において使用される支持体は、PGAおよびPLGAからなる群より選択される少なくとも1成分を含む。より好ましくは、本発明において使用される支持体は、グリコール酸と乳酸との比率が約90：約10～約80：約20であるPLGAを含む。このような比率のPLGAを用いることによって、適度な強度および半減期（およそ1ヶ月～数ヶ月）という性質を達成することができるからである。強度としては、例えば、少なくとも約10N以上であり得、通常約25N以上であり得、好ましくは約50N以上であり得る。より好ましくは約75N以上であり得る。

【0250】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明において使用される支持体にも細胞接着分子を用いることができる。そのような細胞接着分子は、上述したものであり得るが、好ましくは、支持体としての強度を有するものが有利であり得る。そのような強度としては、例えば、約10N以上の強度、約20N以上の強度、約25N以上の強度であり得、好ましくは約50N以上の強度、より好ましくは約75N以上の強度であり得る。応力で表示した場合には、例えば、通常約1MPa以上の強度、約10MPa以上の強度、約20MPa以上の強度、約25MPa以上の強度であり得、好ましくは約50MPa以上の強度、より好ましくは約75MPa以上の強度であり得る。そのような支持体としての強度を保持する細胞接着分子としては、例えば、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニン、インテグリン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリーなどが挙げられるがそれに限定されない。通常の細胞接着分子の一部を改変（例えば、置換基の追加）することによって強度を上げることができる。そのような物質の強度に関する改変は、当該分野において公知の方法を用いて行うことができ、そのような方法は、例えば、高分子機能材料シリーズ医療機能材料 共立出版株式会社、Guoping Cien et al J Biomed mater Res, 51, 273-279, 2000に記載されている。

【0251】

本発明のある実施形態において、本発明において使用される支持体は、それ自体がタンパク質を含んでいてもよい。そのようなタンパク質は、上述したもの（例えば、細胞接着性タンパク質など）であり得るが、好ましくは、支持体としての強度を有するものが有利であり得る。そのような支持体としての強度を保持するタンパク質としては、例えば、フィブロネクチン、コラーゲン、ビトロネクチン、ラミニン、インテグリン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリーなどが挙げられるがそれに限定されない。通常のタンパク質の一部を改変（例えば、（糖または脂質などの）複合体化、置換基の追加）することによって強度を上げることができる。そのような物質の強度に関する改変は、当該分野において公知の方法を用いて行うことができ、そのような方法は、例えば、高分子機能材料シリーズ医療機能材料 共立出版株式会社に記載されている。

【0252】

支持体において上述のタンパク質または細胞接着分子の改変体を用いる場合は、そのような改変体は、生体適合性であることが好ましい。

【0253】

好ましい実施形態において、本発明において使用される支持体は、メッシュ状であり得る。別の実施形態において、そのような支持体は、例えば、膜状、織物様、管状、スponジ状、ファイバー状のような形状をとっていてもよい。ある実施形態では、メッシュ状が好ましい。メッシュ状であると、生体分子が容易にコーティングされ得るからである。し

かし、当業者は、目的によって、そのような形状は適宜選択することができ、当業者は選択した形状を当該分野における周知技術に基づき容易に作製することができる。

【0254】

本発明の支持体は、目的に応じてその厚みを変動することが必要であり得る。そのような支持体は、通常、約0.2mm～約1.0mm厚であることが好ましい。血管などで用いる場合は、そのような支持体は、少なくとも約0.6mm厚であることが好ましくあり得る。

【0255】

好ましくは、本発明の組織片において、支持体は、生体分子でコーティングされていることが有利であり得る。コーティングによって、ほぼ均等に生体分子がその組織片において分布させることができるのである。コーティングの方法は、当該分野において公知であり、例えば、再生医学と生命科学 共立出版；Guoping Cien et al. J Biomed mater Res, 51, 273-279, 2000に記載される手法が考えられるがそれに限定されない。

【0256】

好ましい実施形態では、本発明の組織片において、支持体に隙間がある場合（例えば、メッシュ状の場合）、その隙間は生体分子がふさいでいることが有利であり得る。隙間がふさがれているまたは埋められているとの用語は、その隙間を所望でない流体（例えば、液体または気体）が通り抜けられない状態を意味する。隙間がふさがれていることにより、その組織片から液体または気体がもれ出ることを防止することができるからである。従って、そのような隙間がふさがれている形態は、例えば、血管、心臓など血液に関する臓器の破損の修復などにおいて有用であり得る。

【0257】

好ましくは、本発明において使用される生体分子は、架橋可能な分子を含む。この架橋可能な分子は、支持体との間で架橋処理されている。本発明において使用され得る架橋可能な分子には、例えば、未熟架橋（シップ塩基型架橋）、成熟架橋（ピリジノリン）、老化架橋（ヒスチジノアラニン）コラーゲンなどが挙げられるがそれに限定されない。好ましくは、架橋可能な分子は成熟架橋（ピリジノリン）コラーゲンである。

【0258】

ある実施形態において、本発明で使用される支持体は、本発明に含まれる生体分子と同じ物質を含んでいてもよい。そのような場合、本発明の組織片は、その生体分子のみで形成されることがあり得る。したがって、例えば、本発明の組織片は、HGFのみで形成されていてもよく、コラーゲンのみで形成されていてもよい。ただし、そのような場合、ある程度の強度を保持する必要があり得る。そのような強度を獲得するために、上記生体分子は、改変され得る。そのような改変は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が適宜行うことができる。

【0259】

別の実施形態において、本発明の組織片は、さらに細胞が付着したものであってもよい。本発明は、細胞なしでも自己化を達成することができることにひとつの特徴があるが、細胞がある場合でも、同様な効果（自己化、修復など）を達成することができるが本明細書において示されていることから、そのように細胞を含む形態も本発明の範囲内にあることが理解されるべきである。なぜなら、細胞ありの場合でも、1ヶ月程度で細胞が消去し、自己由来の細胞が生着するからである。

【0260】

1つの実施形態において、本発明の移植片は、体内への移植用のものであり得る。移植用に用いられる場合、その標的となる部位は、例えば、心臓弁、血管、血管様組織、心臓弁、心臓、心膜、硬膜、皮膚、骨、軟部組織、気管などがあるがそれに限定されない。好ましくは、標的となる部位は、血管様組織、心臓弁、心臓、心膜、硬膜、皮膚、骨、軟部組織、気管などであり得る。

【0261】

ある実施形態において、本発明の組織片は、ある臓器または組織の損傷を修復するために用いられ得る。修復を標的とする臓器または組織もまた、上述に記載のものから選択され得る。好ましくは、標的となる損傷部位は、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸、脳、骨、気管、皮膚、血管、軟部組織などであり得る。修復を目的とする場合、本発明の組織片は、その損傷部位と同じまたはそれより大きな面積、好ましくはすべてを覆う程度の広さを有することが好ましいが、それより小さな面積であっても所期の目的は達成可能である。そのように損傷部位を覆う程度の広さを有することによって、損傷により有害な影響を伴う事象（例えば、流血など）を抑えることができ、有利な治療効果を達成することができる。

【0262】

別の実施形態において、本発明の組織片は、臓器または組織の強化のために使用され得る。強化を目的とする場合、本発明の組織片は、その強化を目的とする部位と同じまたはそれより大きな面積、好ましくはすべてを覆う程度の広さを有することが好ましいが、それより小さな面積であっても所期の目的は達成可能である。そのように損傷部位を覆う程度の広さを有することによって、損傷により有害な影響を伴う事象（例えば、流血など）を抑えることができ、有利な治療効果を達成することができる。

【0263】

別の実施形態において、本発明の組織片は、滅菌されていることが好ましい。そのような滅菌をする方法としては例えば、オートクレーブ、乾熱滅菌、薬剤滅菌（例えば、アルコール消毒、ホルマリンガス、オゾンガスなどによる滅菌）、放射線滅菌（ γ 線照射など）などが挙げられ、そのような滅菌は、例えば、アルコール消毒、 γ 線照射、エチレンオキサイドガス滅菌などで行うことができる。従って、本明細書においてある材料、支持体などが滅菌可能とは、少なくとも1つの滅菌方法に対して耐性である性質をいう。滅菌されることにより、感染などの二次的な有害事象を防ぐことができる。

【0264】

別の好ましい実施形態において、本発明の組織片は、その中にかまたはそれに伴って、免疫抑制剤をさらに含んでいてもよい。そのような免疫抑制剤は、当該分野において公知である。免疫抑制の目的では、免疫抑制剤のほか、免疫抑制を達成する別の方法を用いてもよい。上述のような拒絶反応を起こさないようにする免疫抑制法として、免疫抑制剤によるもの、外科的手術、放射線照射等が挙げられる。まず、免疫抑制剤として主なものとして副腎皮質ステロイド薬、シクロスボリン、FK506等がある。副腎皮質ステロイド薬は循環性T細胞の数を減少させ、リンパ球の核酸代謝、サイトカイン産生を阻害してその機能を抑え、マクロファージの遊走および代謝を抑制して免疫反応を抑える。一方、シクロスボリンおよびFK506の作用は類似しており、ヘルパーT細胞の表面にある受容体と結合して細胞内に入り込み、DNAに直接働いてインターロイキン2の生成を阻害する。最終的には、キラーT細胞が機能できなくなり免疫抑制作用が起こる。これらの免疫抑制剤の使用においては副作用が問題となる。ステロイドは特に副作用が多く、また、シクロスボリンは肝臓・腎臓に対する毒性がある。また、FK506は腎臓に対する毒性を有する。次に外科的手術としては、例えば、リンパ節摘出、脾臓摘出、胸腺摘除が挙げられるが、これらについてはその効果が十分に証明されてはいない。外科的手術の中でも胸管ろうとは、循環しているリンパ球を体外に導くものであり効果も確認されているが、大量の血清タンパク質および脂肪の流出を引き起こし、栄養障害が起こりやすくなるという欠点がある。放射線照射には全身照射と移植片照射があるが、効果が不確実な面もあり、レシピエントに対する負担が大きいので、前述の免疫抑制剤との併用により利用されている。上述のいずれの方法も拒絶反応の防止にはあまり好ましくない。

【0265】

本発明の組織片は、さらなる医薬成分を含んでいてもよい。そのような医薬成分は、好ましくは、細胞の集合および結合を妨害しないようなものが有利であり得る。あるいは、そのような医薬成分は、処置を目的とする損傷部位などの改善に有利な作用を有するものが選択され得る。そのような医薬成分としては、例えば、ヘパリン、抗生剤、血管拡張剤、降圧剤（ACE阻害剤、ARB（=ACEレセプタープロッカー））などが挙げられる

がそれらに限定されない。

【0266】

好ましい実施形態において、本発明の組織片において用いられる生体分子は、移植を目的とする生体自体に由来することが有利であり得る。ここで、その生体に由来するとは、その生体から単離したもののはか、その単離体に基づいて合成または複製などをしたものと包含する。このようなものを自己由来ともいう。自己由来の生体分子を用いることによって、免疫拒絶をより効率的に防止することができる。

【0267】

別の実施形態において、本発明は、本発明の生体適合性組織片を含む医薬に関する。そのような医薬は、好ましくは、日本における薬事法などに基づく基準を満たしたものである。したがって、そのような場合、生体適合性組織片に含まれる成分は、そのような基準を満たしたものであり得る。そのような基準を満たしたものとの例としては、例えば、I型コラーゲン、IV型コラーゲンがあるがそれに限定されない。当然、申請すれば基準を満たす状態にあるものは種々存在する。したがって、ここに挙げたものは、現時点ですでに基準を満たすことが当局によって認められているということのみを示し、本発明を限定的に解釈する根拠として用いるべきではないことに留意するべきである。

【0268】

別の局面において、本発明は、本発明の生体適合性組織片およびその組織片の使用法を示した指示書を含む医薬キットまたはシステムに関する。この指示書には、所定の部位に本発明の組織片を移植する方法が記載される。そのような移植は、当該分野において周知の方法によって行うことができ、例えば、そのような方法は、新外科学体系、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）、標準外科学第9版医学書院、心臓の外科 新外科学大系、19A, 19B, 19C, (中山書店)に記載されている。本発明の組織片の移植に際しては、上述の一般的な方法において、過大な圧がかからないということに留意することが好ましくあり得る。

【0269】

本発明の組織片が移植される部位としては、例えば、血管内皮、血管平滑筋、弾性線維、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸、脳、骨、気管、皮膚、血管および軟部組織からなる群より選択される部位があるがそれに限定されない。好ましくは、血管内皮、血管平滑筋 弾性線維、膠原線維などが挙げられる。

【0270】

好ましい実施形態において、本発明において添付される指示書には、本発明の生体適合性組織片を、移植を目的とする臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植することが記載され得る。

【0271】

本発明において添付される指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従つて作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限らず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

【0272】

本発明の組織片およびキットは、ヒトにおいて用いる場合、通常は医師の監督のもとで実施されるが、その国の監督官庁および法律が許容する場合は、医師の監督なしに実施することができる。

【0273】

別の局面において、本発明は、体内における損傷部位を処置する方法を提供する。このような方法は、A) 損傷部位の一部または全部に、A-1) 生体分子；およびA-2) 支持体、を含む、生体適合性組織片を移植する工程、を包含する。ここで、組織片は、損傷部位に直接接触されてもよく、間接的に接触されるような処置を行ってもよい。好ましく

は、本発明の方法における移植工程において、本発明の生体適合性組織片は、損傷部位が属する臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植されることが有利であり得る。一部が残存することにより、残存する組織内に存在する細胞が生体分子によって活性化され得、その結果、自己化が促進され得るからである。

【0274】

好ましい実施形態において、本発明の処置方法では、細胞生理活性物質を投与する工程をさらに包含してもよい。そのような細胞生理活性物質としては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、multi-CSF (IL-3)、白血病抑制因子 (LIF)、c-kitリガンド (SCF)、免疫グロブリンファミリー (CD2, CD4, CD8) 血小板由来増殖因子 (PDGF)、表皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) および血管内皮増殖因子 (VEGF) からなる群より選択され得るがそれらに限定されない。

【0275】

好ましい実施形態において、本発明の方法では、免疫反応を抑制する処置を行う工程をさらに包含し得る。そのような免疫反応を抑制する処置は前述したとおりである。そのような場合、好ましくは、免疫抑制剤を用いることが有利であり得る。

【0276】

別の局面において、本発明は、体内における臓器または組織を強化する方法を提供する。このような方法は、A) 該臓器または組織の一部または全部に、A-1) 生体分子；およびA-2) 支持体、を含む、生体適合性組織片を移植する工程、を包含する。そのような移植の方法は当該分野において周知であり、新外科学体系、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて（改訂第3版）などに記載の方法をそのまま用いるか適宜改良して使用することができる。

【0277】

別の局面において、本発明は、臓器または組織を生産または再生する方法を提供する。この方法は、A) 目的とする臓器または組織の少なくとも一部を含む生体において、該臓器または組織に、A-1) 生体分子；およびA-2) 支持体、を含む、生体適合性組織片を移植する工程；ならびにB) 該臓器または組織を該生体内で培養する工程、を包含する。

【0278】

このように臓器または組織を再生または生産する方法においても、移植工程は上述のものと同じように行うことができる。培養工程は、生体を通常の条件下で飼育することによって行うことができる。そのような飼育条件は、当該分野において周知であり、当業者であれば、動物の種、サイズなどに鑑みて適宜行うことができる。

【0279】

別の局面において、本発明は、本発明の生体適合性移植片の、体内における損傷部位を処置するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性移植片として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0280】

さらに別の局面において、本発明は、本発明の生体適合性移植片の、体内における臓器または組織を強化するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性移植片として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0281】

さらに別の局面において、本発明は、本発明の生体適合性移植片の、体内における損傷部位を処置するための医薬を製造するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性移植片として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0282】

さらに別の局面において、本発明は、本発明の生体適合性移植片の、体内における臓器または組織を強化するための医薬を製造するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性移植片として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0283】

医薬を製造する方法は、当該分野において周知であり、本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第14版またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照）と、所望の程度の純度を有する細胞組成物とを混合することによって、凍結乾燥された状態で調製され保存され得るが、適切な保存液中に保存されることが好ましい。

【0284】

本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。本発明において使用され得る薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、增量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがそれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、支持体および生体分子を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、移植のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

【0285】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

【0286】

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、そして以下が挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、フルロニック（pluronics）またはポリエチレングリコール（PEG））。

【0287】

（複合支持体）

別の局面において、本発明は、新規構造を有する生体適合性組織支持体を提供する。この支持体は、A) 粗面を有する第一層；およびB) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を提供する。この支持体は、生体内に移植され、臓器補填の足場として使用される。ここで、粗面を有する第一層は、通常生体において適用されるとき内側層として使用される。

【0288】

本発明の1つの実施形態において、通常、この粗面を有する第一層として、縞物が使用される。縞物として使用される材料は、縞むことができ、生体適合性である限りどのような材料を使用してもよい。縞物は、当該分野において公知の任意の製造方法を用いて製造することができる。縞物は、材料を糸状にし、その糸で輪を作り、その輪を順々につなげていくことによって作製することができる。縞物は、このように輪をつなげていくことから、隙間がひらき、細胞を収容するに十分なスペースを作製することができる。この場合、同じように織物とする場合よりも厚みが大きな層が提供される。

【0289】

本発明の1つの実施形態において、本発明の支持体の第二層としては、織物が使用される。織物として使用される材料は、織ることができ、生体適合性である限りどのような材料を使用してもよい。織物の製造方法としては、当該分野において公知の任意の方法を用いることができ、織物は、例えば、縦部分（縦糸ともいう）と横部分（横糸ともいう）とを交互に織り込んでいくことによって製造することができる。織物は、隙間がほとんどないことから、液体（例えば、血液のような体液）がもれにくくなる。

【0290】

本発明はまた、生体適合性であり得る縞物と織物との組織片層を重ね合わせ、中間層により封着する構造を提供することによって、縞物において見られた漏れの問題と、織物において見られたほつれの問題を、予想外に両方とも解決した。このように縞物と織物とを複合したことによって、さらに、細胞が入り込むスペースを有しつつ、漏れを防ぎ、解れが防止されている材料を予想外に提供することができた。さらに、このような支持体に生体分子（コラーゲンなど）を提供することによって、生体内に提供した場合に初期には細胞を呼び込み、その後その支持体自体は生体により分解され、消失し、実質的に跡形も残らない移植片を提供することができる。したがって、好ましくは、内側層として使用される第一層の方が、第二層よりも生分解性が早い方が有利であるが、それに限定されない。また、この複合支持体は、縞物と織物との作製において任意の方法を選択することによって、強度を保ち、一定の厚みを有することができる。さらに、縞みと織りに用いる糸に任意の材料を用いることによって、それぞれの吸収速度を制御することができ、さらには、組織の再生速度と支持体に必要な強度とに適合した支持体を作成することができるというように、種々の応用が考えられる。

【0291】

1つの実施形態において、本発明の第一層における粗面は、細胞が入り込むに充分なスペースを有する。細胞が入り込むに充分なスペースを有することによって、組織片として移植された後に、細胞が生着することが容易になるという効果が奏される。あるいは、このようなスペースは、細胞を予め本発明の支持体に付与する場合にも、細胞の担持に利用することができる。

【0292】

1つの好ましい実施形態では、本発明の支持体は、中間層を有する。中間層を有することによって、第一層と第二層とを効率よく密着または封着させることができるからである。

【0293】

1つの実施形態において、中間層による封着は、生体吸収性高分子を融着することにより達成される。このような封着は任意の手段を用いて実行することができる。封着としては、例えば、融点の違いを利用して、封着が企図される層よりも融点が低い材料を中間層として使用し、その中間層材料の融点より高く、他の層の材料の融点よりも低い温度に加熱することによって達成することができる。あるいは、フィブリンのような生体物質をのりとして使用することも可能である。中間層は、フィルムのような形態をとることが好ましいがそれに限定されない。

【0294】

好ましい実施形態において、本発明の第二層は、通気性が実質的に遮断されることが好ましい。通気性が実質的に遮断されているかどうかは、水漏れ試験を行なうことによって

確認することができる。

【0295】

本発明の支持体が有する強度は、通常、少なくとも約10N以上、より好ましくは、約20N以上、さらに好ましくは約50N以上、なおさらに好ましくは、引張り試験において、力で表示する場合、少なくとも100Nであり得る。応力で表示した場合には、例えば、通常約1MPa以上の強度、約10MPa以上の強度、約20MPa以上の強度、約25MPa以上の強度であり得、好ましくは約50MPa以上の強度、より好ましくは約75MPa以上の強度であり得る。

【0296】

本発明の支持体は、弾性率でみると、本発明の支持体は、通常多くとも100MPaの弾性率を有し、好ましくは多くとも約80MPaの弾性率を有するが、本発明の支持体は、使用に耐え得る限り、天然物よりも劣る弾性率を有していてもよい。伸びに関しては、本発明の支持体は、通常少なくとも105%、好ましくは110%の伸びを有する。伸びは、縦方向と横方向とを両方測定する。この両方の伸びにはばらつきがないほうが好ましいがそれに限定されない。用途に応じて、伸びに関する特性は、例えば、少なくとも120%、好ましくは150%であることが好ましいが、それに限定されない。伸びに関する特性についても、本発明の支持体は、使用に耐え得る限り、天然物よりも劣る伸びを有していてもよい。

【0297】

1つの実施形態において、本発明の支持体の通気性は、通常、 $25\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下であり、より通常には、 $15\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下であり、好ましくは $10\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下であり、より好ましくは、約 $5\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下であり、さらに好ましくは約 $4\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下であり、もっとも好ましくは、約 $3\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 以下である。ここで、従来の編物および織物のみでは、せいぜい約 $5\text{ m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$ 程度までしか達成できていなかったが、本発明の支持体では、予想外にそれよりも優れた通気性を有する支持体を提供することができたという効果を達成する。本明細書において、支持体の通気性は、JIS-L-1096Aに準じて測定することができる。このような測定方法では、フラジール型試験機に試験片を取り付けた後、加圧抵抗器によって傾斜形気圧計が125Paの圧力を示すように調節し、通過する空気量($\text{m}1/\text{cm}^2/\text{sec}$)を測定することによって通気性を決定する。通気性はまた、水漏れ率に関連する数値をとることから、水漏れ率によって、通気性を表現してもよい。このような場合、好ましい水漏れ率としては、例えば、60秒、10m1のうち、5m1以下、好ましくは3m1以下、より好ましくは2m1以下、さらに好ましくは1m1以下であることが有利である。

【0298】

1つの実施形態において、本発明の支持体の第一層および/または第二層は、独立して選択される生体分解性材料を含む。好ましくは、第一層および第二層の両方が生体分解性材料を有していることが好ましい。生体分解性材料の分解速度は、細胞が生着するに充分な期間(例えば、数ヶ月)をとることが好ましい。

【0299】

このような生体分解性材料としては、ポリグリコール酸(PGA)、ポリL乳酸(PLA)およびポリカプロラクタム(PCLA)ならびにそれらの共重合体からなる群より選択される少なくとも1成分またはそれらの混合物であり得る。あるいは、このような生体分解性ポリマーは、グリコール酸と乳酸との比率が約90:約10~約80:約20であるPLGAを含んでいてもよい。

【0300】

好ましい実施形態において、本発明の支持体の第一層は、ポリグリコール酸を含む。編物として製造することが容易であるからである。また、細胞の生着も良好であるからである。

【0301】

別の好ましい実施形態において、本発明の支持体の第二層は、ポリL乳酸を含む。織物として製造することが容易であるからである。また、細胞の生着も良好であるからである。

【0302】

好ましい実施形態において、本発明の第二層は、織物であり、第一層は編物である。このような構造をとることによって、細胞との生着性を高め、かつ、強度を保持する支持体を提供することができる。このような構造を有する支持体はこれまでに存在しておらず、従来の支持体では達成できなかった効果を提供する。このような組み合わせの支持体はまた、コラーゲン、ラミニンなどの生体分子との組み合わせによって、さらに細胞の生着を高め、再生修復のための機能を高めることができる。

【0303】

好ましい実施形態において、本発明の支持体では、第二層は、ポリL乳酸の織物であり、第一層は、ポリグリコール酸の編物であることが有利である。このような構造を有することによって、強度を保ち、漏れを防ぎ、生体分子（例えば、コラーゲン）のスペースを収容し得、支持体に一定の厚みを付与し、ほつれを防止し、強度および厚みをコントロールすることができるという従来の支持体では、到底達成し得なかった効果を達成する。例えば、従来の織構造を有する支持体では、強度を保つことはできたが、細胞との生着性が担保できなかった。

【0304】

1つの実施形態において、中間層は、合成生体吸収性ポリマーを含む。ここで、このポリマーは、ポリ乳酸系フィルムまたはカプロラクタムフィルムであることが好ましい。このようなフィルムは、融点が低く、接着が容易であるので、製造が容易であるからである。従って、好ましい実施形態では、中間層を構成する材料は、第一層および第二層の少なくとも一方、好ましくはその両方の融点よりも低い融点を有する。

【0305】

第一層および第二層は、一層のみから構成されていてもよいが、複数の層から構成されていてもよい。好ましい実施形態では、第一層は、複数の編物層を含む。別の好ましい実施形態では、第二層は、複数の織物層を含む。第一層は、編物に加えて別の層（例えば、織物）を含んでいてもよい。

【0306】

他の好ましい実施形態では、第一層に、生体分子が配置されていてもよい。この実施形態では、上述の生体分子付着組織片に関して記載される任意の実施形態を使用してもよい。ここで好ましくは、生体分子は、細胞外マトリクスである。特に好ましい生体分子は、コラーゲンおよびラミニンからなる群より選択される細胞外マトリクスを含む。

【0307】

生体分子は、好ましくは、生体分子は、マイクロスponジに含ませて配置される。このようなマイクロスponジは、細胞の足場として適切な形態であることから、望ましい形態である。

【0308】

好ましくは、生体分子は、支持体と架橋処理されていることが有利である。コラーゲンが使用される場合、この架橋は、コラーゲン架橋処理によって実施される。

【0309】

別の局面において、本発明は、本発明の支持体を含む医薬を提供する。この医薬において使用される支持体は、上述の任意の支持体の形態をとりえる。本発明の支持体は、細胞を含まなくても支持体として使用することができる特徴であるが、別の実施形態において、本発明の医薬は、細胞をさらに含んでいてもよい。

【0310】

1つの実施形態において、本発明の医薬は、体内への移植用途に使用される。移植された後、細胞がこの支持体に生着するという効果が見出されている。このような効果は、従来の支持体では考えられなかった効果であり、数週間から数ヶ月すると、細胞が組織化し

て、移植された部分を修復することができる。好ましい実施形態では、生体分解性の材料が使用されることから、移植部分の修復がなされると前後して材料自体は消失することになる。このように、本発明の支持体は、完全に天然と同じ状態に修復することができるという格別の効果を達成する。このような効果は、従来の支持体、パッチなどでは達成できなかつたものである。

【0311】

特定の実施形態において、本発明の支持体が体内において移植されるべき部位は、心臓、心臓弁、血管、心膜、心臓隔壁、心内導管、心外導管、硬膜、皮膚、骨、軟部組織および気管などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、液体（例えば、血液）が流れる部分での適用が好ましい。そのような部分としては、消化管、血管、心臓、心臓弁などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0312】

好ましい実施形態において、本発明の医薬において用いられる生体分子は、移植を目的とする生体に由来することが有利であるが、それに限定されない。このような宿主と同じ起源の生体分子は、免疫反応等がほとんどないと考えられることから、有利であると考えられる。ただし、生体分子は、精製されたものであれば、免疫反応は通常起きないと考えられることから、特に起源を限定する必要はない。

【0313】

（支持体製造法）

別の局面において、本発明は、A) 粗面を有する第一層；およびB) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体、を含む、生体適合性組織支持体を製造する方法を提供する。この方法は、該第一層と該第二層とを接着する工程を包含する。接着する工程としては、例えば、超音波ミシン、UV光などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0314】

超音波ミシンは当該分野において公知の手法を用いることができる。そのような手法としては、例えば、市販の超音波シーラー（例えば、アームタイプ（例えば、プラザーUS-1150）、CNCタイプ（US-7010）、ユニットタイプ（US-2150）（プラザー社、愛知、日本）から入手可能）を用いる手法が挙げられる。

【0315】

1つの実施形態では、この製造法は、a) 該第一層と該第二層との間に該中間層を提供する工程；b) 該第一層と該第二層とが融解せず、該中間層が融解する条件に該第一層、該第二層および該中間層を配置する工程；およびc) 該第一層、該第二層および該中間層を所望の形状に保持しながら該中間層が固化する条件に配置する工程、を包含する。

【0316】

ここで、好ましい実施形態では、融解する条件は、温度による違いを利用し、前記第一層および前記第二層のいずれか一方の融点より、好ましくは両方の融点より前記中間層の融点が低い。

【0317】

好ましい実施形態において、本発明の支持体の第二層は、ポリL乳酸の織物であり、第一層は、ポリグリコール酸の織物であり、前記中間層は、ポリ乳酸系フィルムまたはカプロラクタムフィルムであって、ここで、上記融解する条件の温度は、80℃を超え～140℃以下であり、好ましくは100℃～140℃であることが有利である。

【0318】

別の好ましい実施形態において、中間層としてカプロラクタムが使用される場合、融解させる温度は、約80℃～約140℃であることが有利である。このような温度で接着させると、接着強度が他の温度に比して格段に（2倍以上）向上した。したがって、好ましい温度としては、中間層として使用される材料の融点より高く、第一層および第二層として使用されるそれぞれの材料の融点よりも低い温度が使用される。

【0319】

他の実施形態において、本発明の支持体の製造法において、本発明の支持体は、さらに生体分子を含む。この場合、本発明の方法は、生体分子を前記第一層に付着させる工程をさらに包含する。このような付着工程は、どのような技術を用いても実施することができるが、好ましくは、架橋処理を包含する。

【0320】

1つの実施形態において、本発明の支持体において使用される生体分子はコラーゲンであり、この場合付着は、コラーゲン架橋処理を包含する。

【0321】

1つの実施形態において、本発明の支持体の中間層は、ガラス上にキャストした後風乾してフィルムを作成することによって製造される。このようなフィルムは、封着に適していることから、本発明の支持体を製造するために好ましく使用され得る。

【0322】

1つの実施形態において、本発明の付着工程では、少なくとも約 0.1 g/cm^2 の重りで上から圧力をかけることが好ましい。このような重りは、より好ましくは、少なくとも約 0.5 g/cm^2 の重りであり、さらに好ましくは 0.75 g/cm^2 であり得る。

【0323】

(治療法)

別の局面において、本発明は、体内における損傷部位を処置する方法を提供する。このような方法は、A) 上記損傷部位の一部または全部に、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程、を包含する。ここで、組織片は、損傷部位に直接接触されてもよく、間接的に接触されるような処置を行ってもよい。好ましくは、本発明の方法における移植工程において、本発明の生体適合性組織片は、損傷部位が属する臓器または組織の少なくとも一部が残存するように移植されることが有利であり得る。一部が残存することにより、残存する組織内に存在する細胞が生体分子によって活性化され得、その結果、自己化が促進され得るからである。本発明の損傷部位の処置方法において使用される生体適合性組織支持体としては、本明細書において記載される任意の支持体が使用され得る。

【0324】

好ましい実施形態において、本発明の処置方法では、細胞生理活性物質を投与する工程をさらに包含してもよい。そのような細胞生理活性物質としては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、multi-CSF(IL-3)、白血病抑制因子(LIF)、c-kitリガンド(SCF)、免疫グロブリンファミリー(CD2, CD4, CD8)、血小板由来増殖因子(PDGF)、表皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝細胞増殖因子(HGF)および血管内皮増殖因子(VEGF)からなる群より選択され得るがそれらに限定されない。

【0325】

好ましい実施形態において、本発明の方法では、免疫反応を抑制する処置を行う工程をさらに包含し得る。そのような免疫反応を抑制する処置は前述したとおりである。そのような場合、好ましくは、免疫抑制剤を用いることが有利であり得る。

【0326】

別の局面において、本発明は、体内における臓器または組織を強化する方法を提供する。このような方法は、A) 該臓器または組織の一部または全部に、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程、を包含する。そのような移植の方法は当該分野において周知であり、新外科学体系、心臓移植・肺移植 技術的、倫理的整備から実施に向けて(改訂第3版)などに記載の方法をそのまま用いるか適宜改良して使用することができる。本発明の強化方法において使用される生体適合性組織支持体としては、本明細書において記載される任意の支持体が使用さ

れ得る。

【0327】

別の局面において、本発明は、臓器または組織を生産または再生する方法を提供する。この方法は、A) 目的とする臓器または組織の少なくとも一部を含む生体において、該臓器または組織に、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を移植する工程；ならびにB) 該臓器または組織を該生体内で培養する工程、を包含する。本発明の再生方法において使用される生体適合性組織支持体としては、本明細書において記載される任意の支持体が使用され得る。

【0328】

このように臓器または組織を再生または生産する方法においても、移植工程は上述のものと同じように行うことができる。培養工程は、生体を通常の条件下で飼育することによって行うことができる。そのような飼育条件は、当該分野において周知であり、当業者であれば、動物の種、サイズなどに鑑みて適宜行うことができる。

【0329】

別の局面において、本発明は、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における損傷部位を処置するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性組織支持体として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0330】

さらに別の局面において、本発明は、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における臓器または組織を強化するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性組織支持体として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0331】

さらに別の局面において、本発明は、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における損傷部位を処置するための医薬を製造するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性組織支持体として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0332】

さらに別の局面において、本発明は、A-1) 粗面を有する第一層；およびA-2) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、上記第一層と上記第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体の、体内における臓器または組織を強化するための医薬を製造するための使用に関する。この使用において、使用される生体適合性組織支持体として好ましい実施形態は、本明細書において記載される任意の形態が使用され得る。

【0333】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0334】

(実施例1：PLGAを用いた実験)

本実施例では、PLGAを支持体として用い、コラーゲンI型およびIV型を生体分子として用いて組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0335】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるVycrylのポリラクチン910メッシュ（グリコール酸と乳酸の比率が90:10の共重合体、PLGA）を内腔側にニットメッシュ（nit ted mesh）1枚、外側にウーブンメッシュ（woven mesh）2枚の計3枚重ね（各0.2mm、計0.6mm厚）とし、それにコラーゲンを架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜を足場とした。コラーゲンを架橋剤としてはコラーゲンI型のみを架橋処理した群、コラーゲンI型にさらにコラーゲンIV型を架橋した群を作製した（図1）。架橋方法は、以下のとおりである。図2には、左第5肋間開胸した際の様子を示す。肺動脈主幹部に径20mmのパッチを縫着した。

【0336】

<架橋方法>

細胞外マトリクス（例えば、コラーゲンI型、コラーゲンIV型、ラミニンなど）の溶液に対して、必要に応じて終濃度1/10量のIV型コラーゲンまたはラミニンを加える。この溶液に上記支持体を含浸させる。次に、凍結乾燥、37℃グルタルアルデヒド飽和蒸気により4時間程度架橋処理する。最後に、0.1Mグリシン水溶液中で15分間3回振盪させ、蒸留水で3回洗浄し、凍結乾燥を行った。これにより、種々の細胞外マトリクス含有支持体を作製した。

【0337】

<機械強度>

PLGA-コラーゲン複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した。（TENSILLON ORIENTEC）。コントロールとしてグルタルアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。引っ張り強度はPLGA-コラーゲン複合膜が75±5N、グルタルアルデヒド処理ウマ心膜が34±11Nであり、PLGA-コラーゲン複合膜のほうが引っ張り強度が高かった（図3）。

【0338】

<細胞接着の効率>

PLGA-コラーゲン複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体（PKH-26（SIGMA））で標識した血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）をコラーゲンI型のみを架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜とコラーゲンI型にさらにIV型架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域（%）を比較すると血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）のいずれの細胞においてもコラーゲンI型、IV型架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた（図4）。

【0339】

以上の結果よりコラーゲンI型およびIV型で架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜が強度も従来のグルタルアルデヒド処理ウマ心膜と同等以上であり、細胞性生着性も高いことから、このPLGA-コラーゲン複合膜を使用し、事前の細胞播種の効果をインビトロにおける検討を行った。

【0340】

<第VIII因子染色>

血管数の計数は、第VIII因子関連抗原等で免疫組織化学染色した後に計数することによって判定することができる。この計数方法では、検体を10%の緩衝化ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、各々の検体から数個の連続切片を調製し、凍結する。次いで、凍結切片をPBS中の2%パラホルムアルデヒド溶液で5分間、室温にて固定し、3%過酸化水素を含むメタノール中に15分間浸漬し、次いでPBSで洗浄する。このサンプルをウシ血清アルブミン溶液で約10分間覆って、非特異的反応をプロックする。検体を、HRPと結合する、第VIII因子関連抗原に対するEPOS結合体化抗体と共に一晩イン

キュベートする。サンプルをPBSで洗浄した後、これらを、ジアミノベンジジン溶液（例えば、PBS中、0.3mg/mlジアミノベンジジン）中に浸漬して、陽性染色を得る。染色された血管内皮細胞を、例えば、200倍の倍率の光学顕微鏡下で計数し、例えば、計数結果を、1平方ミリメートルあたりの血管の数としてあらわす。特定の処置後、血管数が統計学的に有意に増加しているか否かを判定することにより、第VIII因子の存在を確認し、これにより例えば、血管内皮細胞の確認および血管新生活性を判定することができる。

【0341】

〈エラスチカ・ファン・ギーソン染色〉

弾性線維を染色するために、エラスチカ・ファン・ギーソン染色を行った。その手順は以下のとおりである。必要に応じて脱パラフィン（例えば、純エタノールにて）、水洗を行い、武藤化学などから入手可能なレゾルシンフクシン液に40～60分間サンプルを浸す。その後70% アルコールでサンプルを洗浄し、オムニのヘマトキシリンに15分間浸す。その後、流水水洗を5分行い、ファン（ワン）・ギーソン液に2分浸す。水洗しすばやく脱水し、透徹し、封入する。

【0342】

〈ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色〉

細胞における支持体の定着・消長を観察するために、HE染色を行った。その手順は以下のとおりである。必要に応じて脱パラフィン（例えば、純エタノールにて）、水洗を行い、オムニのヘマトキシリンでサンプルを10分浸した。その後流水水洗し、アンモニア水で色出しを30秒間行った。その後、流水水洗を5分行い、塩酸エオジン10倍希釈液で2分間染色し、脱水し、透徹し、封入する。

【0343】

〈von Kossa染色〉

細胞における石灰化を観察するために、フォン・コッサ法によって染色した。その手順は以下のとおりである。必要に応じて脱パラフィン（例えば、純エタノールにて）、水洗（蒸留水）を行い、25% 硝酸銀液（間接光下）に2時間浸す。その後、蒸留水水洗し、42% 2% チオ硫酸ナトリウム（ハイポ）に5分浸す。その後、流水水洗を5分行い、次いでケルンエヒテロートに5分浸す。その後、流水水洗を5分行い、脱水し、透徹し、封入する。

【0344】

〈移植〉

コラーゲンI型およびIV型架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜（15x10mm）と、この複合膜に自己の血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）を播種した膜を作製し、ビーグル成犬（8～10kg）の肺動脈主幹部に部分遮断（partial clamp）下に移植した。

【0345】

細胞は同種のビーグル成犬の下肢表在静脈を摘出し、血管内皮細胞、および平滑筋細胞（VSMCs）を単離培養。PLGA-コラーゲン複合膜に血管内皮細胞、平滑筋細胞をそれぞれ 1.3×10^6 cells/cm²の密度で播種した。移植後、2週、2ヶ月、6ヶ月後に摘出し組織学的に検討を行った。

【0346】

（インビボ：移植2週後）

PLGA-コラーゲン複合膜および自己細胞を播種したPLGA-コラーゲン複合膜の両群とも肉眼的に明らかな血栓形成は認めなかった。HE染色ではPLGAの残存を認め、その間は結合織が介在していた。自己の血管内皮細胞および平滑筋細胞を播種したPLGA-コラーゲン複合膜では蛍光抗体標識した播種した血管内皮細胞は内腔側に散在しているのみであり、多くの細胞はPLGA-コラーゲン複合膜より脱落していることが示唆された（図5）。

【0347】

(インビボ：移植2ヶ月後)

PLGA-コラーゲン複合膜および自己細胞を播種したPLGA-コラーゲン複合膜の両群とも肉眼的に内腔側表面は平滑で、HE染色でPLGAは完全に吸収されており正常の血管と比較しても遜色のない組織構造であった(図6)。

【0348】

血管内皮細胞を第VIII因子染色にて、平滑筋細胞 α -SMA免疫染色にて検討した。両群とも第VIII因子免疫染色で単層の連続する血管内皮細胞を認め(図7)、 α -SMA免疫染色で内腔側に配向性を有した平滑筋細胞を認めた(図8)。さらにエラスチカ・ファン・ギーソン(elastica-van Gieson)染色にて血管の弾性纖維を検討した。両群とも血管内層に弾性纖維の発現が認められた(図9)。

【0349】

(インビボ：移植6ヶ月後)

両群とも移植後2ヶ月目に見られたのと同様に第VIII因子免疫染色で単層の連続する血管内皮細胞を認めた(図10)。平滑筋細胞は移植後2ヶ月目に見られたよりもさらにその形態を明らかにし、 α -SMA免疫染色で内腔側に配向性を有し、正常血管とほぼ同等であった。エラスチカ・ファン・ギーソン染色にておける血管弾性纖維も移植後2ヶ月目に見られたよりも血管内層に弾性纖維の発現が認められた(図11)。

【0350】

さらに、血管の石灰化の有無はフォンコッサ(von Kossa)染色において移植した複合膜および周辺血管に陽性反応を認めず、石灰沈着は認められなかった(図12)。

【0351】

(考察)

現在開発中世界で開発中の組織工学を応用下した人工パッチ(Tissue Engineered Bioprosthetic Patch)の問題点としてより自己組織に近い細胞外環境を構築した構造物となりうるかとの課題がある。通常、血管修復用人工パッチは小児の心臓血管外科領域にて用いられ自己化(成長の可能性)が重要な要素である。このため、自己の細胞を生体内吸収性高い素材に培養して再生血管を作製することが考えられるが、自己の細胞を事前に採取する必要性があり、さらに、その細胞を単離分離、培養する技術と装置、構造物への播種しの方法等多くの問題がある。

【0352】

一方最近、インサイチュで前駆細胞(progenitor cell)の発現が報告されている。浅原らは成体の血管形成が血管新生(angiogenesis)と呼ばれる組織既存の血管からの血管造成だという概念を覆し、成体にも、胎児発生に見られるような、血管幹細胞・前駆細胞から新たな血管を創り出すメカニズムである血管発生(vasclogenesis)が存在することが明らかにした。(Asahara T, et al (2000) Stem cell therapy and gene transfer for regeneration, Gene Therapy 7, 451-457; Takahashi T, et al (1999) Nat. Med. 4, 434-438; Asahara T, et al (1999) EMBO J. 18, 3964-3972; Isner J, et al (1999) J. Clin. Invest. 103, 1231-1236; Asahara T, et al (1997), Science 275, 964-967)。

【0353】

また、骨髄間質細胞には間葉系組織(血管、筋肉、脂肪、骨、軟骨など)に分化する間葉系幹細胞が含まれることが古くから知られており(Science 276, 71-74, 1997)この間葉系幹細胞は幹細胞としての性質である自己複製能と多分化能を備えている。Orlicらはこの骨髄由来の幹細胞を取り出し利用することにより心筋梗塞などにより損傷した心筋や血管網を再生し、心臓の機能を改善することが試みている。

Nature 410, 701-705, 2001; Proc Natl Acad Sci USA 98, 10344-10349, 2001; Ann NY Acad Sci 938, 221-229, 2001).

【0354】

一方、コラーゲンは、動物界に最も広く存在するタンパク質で、動物の体の全タンパク質の1/3以上を占め、動物の皮膚・腱・骨などの結合組織を構成している。動物の体は多数の細胞から構成されているが、コラーゲンは、これらの細胞と細胞との間のマトリクスとして、重要な役割を果たしている。コラーゲンの生体における役割は、動物の体の構造を支えることだけと考えられていた。しかし、最近になってコラーゲンは、細胞の発生、分化、形態形成等において、細胞間マトリックスとして、細胞に生物学的な影響を及ぼしていることが明らかになり（永井裕、藤本大三郎編、コラーゲン代謝と疾患。講談社（1982）、J. Yang & S. Nandi, Int. Rev. Cytol., 81, 249-286 (1983)）、コラーゲンを細胞培養に利用することは、有益であろうと考えられる。コラーゲン基質の利用は、ガラス、プラスチック基質よりも細胞の接着、増殖、分化などを促進するという実験が数多く報告されている（J. Yang & S. Nandi, Int. Rev. Cytol., 81, 249-286 (1983)）。コラーゲン上とガラス上での各種細胞の成長を比較したのは、EhrmannおよびGeyが最初である（R. L. Ehrmann & G. O. Gey, Natl. Cancer Inst., 16 (6), 1375-1400 (1956)）。1953年Grobsteinは、コラーゲン基質が細胞増殖と形態形成に関して重要な役割を果たしていると報告した（C. Grobstein, Exp. Zool., 124, 383-388 (1953)）。また、角膜内皮細胞（D. Gospodarowicz, G. Greenberg & C. R. Birdwell, Cancer Res., 38, 4155 (1978)）、乳腺上皮細胞（M. Wicha, L. A. Liotta, S. Garbisa & W. R. Kidwell, Exp. Cell. Res., 124, 181 (1979)）、表皮細胞（J. C. Murray, G. Stingle, H. K. Kleinman, G. R. Martin & S. I. Katz, J. Cell Biol., 80, 197 (1978)）、肝実質細胞（C. A. Sottiler, & G. Micalopoulos, Cancer Res., 38, 1539 (1978)）、線維芽細胞（G. O. Gey, M. Suoteli, M. Foard & F. B. Bang, Exp. Cell Res., 84, 63 (1974)）は、プラスチック、または、ガラス製培養皿よりも、コラーゲン基質上で長期間生存することも報告されている。したがって、本発明では、コラーゲンは、上述の臓器または組織を対象にした移植に有用であることは理解され得る。

【0355】

今回行った検討では、コラーゲンI型およびIV型架橋処理した場合、細胞播種した細胞は生着率が改善した。これはコラーゲンI型およびIV型が、細胞の発生、分化、形態形成等において、細胞間マトリックスとして、特に有用な役割を果たすことが示されるものである。

【0356】

今回行った検討では、コラーゲンI型およびIV型架橋処理した場合、細胞播種に関わらず自己組織化が認められた。この構造物内に生着した細胞は自己の細胞に他ならず、生体内を浮遊する幹細胞が生着し、コラーゲンI型およびIV型架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜を足場とし、同部位で分化、増殖したのではないかと推察される。

【0357】

（まとめ）

生体分解性高分子を足場としたPLGA-コラーゲン複合膜は、エキソビボでの細胞播種なしでも移植後2ヶ月で血管壁構造の再構築が見られ、6ヶ月後も石灰化を認めず、自己化をめざした心血管修復用人工パッチとして右心系での有用性が期待できた。したがって、このような組織片は、従来の技術では達成することができなかつた格別の効果を示す

【0358】

(実施例2：PGAを用いた実験)

本実施例では、PGAを支持体として用い、コラーゲンI型およびIV型を生体分子として用いて組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0359】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるPGAのメッシュを内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね（各0.2mm、計0.6mm厚）とし、それにコラーゲンを架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜を足場とした。コラーゲンを架橋剤としてはコラーゲンI型のみを架橋処理した群、コラーゲンI型にさらにコラーゲンIV型を架橋した群を作製した。架橋処理は実施例1に記載のように行った。

【0360】

<機械強度>

PLGA-コラーゲン複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した。（TENSILLON ORIENTEC）コントロールとしてグルタールアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。

【0361】

<細胞接着の効率>

PGA-コラーゲン複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体（PKH-26（SIGMA））で標識した血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）をコラーゲンI型のみを架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜とコラーゲンI型にさらにIV型架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域（%）を比較すると血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）のいずれの細胞においてもコラーゲンI型、IV型架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0362】

以上の結果よりコラーゲンI型およびIV型で架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜が強度も従来のグルタールアルデヒド処理ウマ心膜と同等以上であり、細胞性生着性も高いことから、このPGA-コラーゲン複合膜を使用し、事前の細胞播種の効果をインビトロにおける検討を行った。

【0363】

<移植>

コラーゲンI型およびIV型架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜（15×10mm）と、この複合膜に自己の血管内皮細胞（VECs）および平滑筋細胞（VSMCs）を播種した膜を作製し、ビーグル成犬（8～10kg）の肺動脈主幹部に部分遮断下に移植した。

【0364】

細胞は同種のビーグル成犬の下肢表在静脈を摘出し、血管内皮細胞、および平滑筋細胞（VSMCs）を単離培養。PGA-コラーゲン複合膜に血管内皮細胞、平滑筋細胞をそれぞれ 1.3×10^6 cells/cm²の密度で播種した。移植後、2週、2ヶ月、6ヶ月後に摘出し組織学的に検討を行った。

【0365】

(インビトロ：移植2週後)

PGA-コラーゲン複合膜および自己細胞を播種したPGA-コラーゲン複合膜の両群とも肉眼的に明らかな血栓形成は認めなかった。HE染色ではPGAの残存を認め、その

間は結合織が介在していた。自己の血管内皮細胞および平滑筋細胞を播種したPGA-コラーゲン複合膜では蛍光抗体標識した播種した血管内皮細胞は内腔側に散在しているのみであり、多くの細胞はPGA-コラーゲン複合膜より脱落していることが示唆された。

【0366】

(インビボ：移植2ヶ月後)

PGA-コラーゲン複合膜および自己細胞を播種したPLGA-コラーゲン複合膜の両群とも肉眼的に内腔側表面は平滑で、HE染色でPLGAは完全に吸収されており正常の血管と比較しても遜色のない組織構造であった。

【0367】

血管内皮細胞を第VIII因子染色にて、平滑筋細胞 α -SMA免疫染色にて検討した。両群とも第VIII因子免疫染色で単層の連続する血管内皮細胞を認め、 α -SMA免疫染色で内腔側に配向性を有した平滑筋細胞を認めた。

さらにエラスチカ・ファン・ギーソン染色にて血管の弾性纖維を検討した。両群とも血管内層に弾性纖維の発現が認められた。

【0368】

(インビボ：移植6ヶ月後)

両群とも移植後2ヶ月目に見られたのと同様に第VIII因子免疫染色で単層の連続する血管内皮細胞を認めた。平滑筋細胞は移植後2ヶ月目に見られたよりもさらにその形態を明らかにし、 α -SMA免疫染色で内腔側に配向性を有し、正常血管とほぼ同等であった。エラスチカ・ファン・ギーソン染色における血管弾性纖維も移植後2ヶ月目に見られたよりも血管内層に弾性纖維の発現が認められた。

【0369】

さらに、血管の石灰化の有無はフォンコッサ染色において移植した複合膜および周辺血管に陽性反応を認めず、石灰沈着は認められなかった。

【0370】

(実施例3：スポンジ状PGAを用いた実験)

本実施例では、スポンジ状PGAを支持体として用い、コラーゲンI型およびIV型を生体分子として用いて組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0371】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

＜足場設計＞

生体分解性合成高分子であるPGAのスポンジを内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm, 計0.6mm厚)とし、それにコラーゲンを架橋処理したスポンジ状PLGA-コラーゲン複合膜を足場とした。コラーゲンを架橋剤としてはコラーゲンI型のみを架橋処理した群、コラーゲンI型にさらにコラーゲンIV型を架橋した群を作製した。架橋処理は、実施例1に記載されるように行った。

【0372】

＜機械強度＞

スポンジ状PLGA-コラーゲン複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した。(TENSILON ORIENTEC)コントロールとしてグルタルアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。

【0373】

＜細胞接着の効率＞

スポンジ状PGA-コラーゲン複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA))で標識した血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)をコラーゲンI型のみを架橋処理したスポンジ状PGA-コラーゲン複合膜とコラーゲンI型にさらにIV型架橋処理したスポンジ状PGA-コラ

ーゲン複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)のいずれの細胞においてもコラーゲンI型、IV型架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0374】

(実施例4：フィブロネクチンを用いた実験)

本実施例では、PLGAを支持体として用い、フィブロネクチンを生体分子として用いて組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0375】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるVycrylのポリラクチン910メッシュ(グリコール酸と乳酸の比率が90:10の共重合体、PLGA)を内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm、計0.6mm厚)とし、それにフィブロネクチンを架橋処理したPLGA-フィブロネクチン複合膜を足場とした。肺動脈主幹部に径20mmのパッチを縫着した。

【0376】

<機械強度>

PLGA-フィブロネクチン複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した。(TENSILLON ORIENTEC)コントロールとしてグルタールアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。

【0377】

<細胞接着の効率>

PLGA-フィブロネクチン複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA))で標識した血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)をフィブロネクチン架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)のいずれの細胞においてもフィブロネクチン架橋処理したPLGA-フィブロネクチン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0378】

(実施例5：フィブロネクチンのコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)とのHGF融合蛋白を用いた実験)

本実施例では、PLGAを支持体として用い、フィブロネクチンを生体分子として用いてさらにコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)にHGF融合蛋白を付けその組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0379】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるVycrylのポリラクチン910メッシュ(グリコール酸と乳酸の比率が90:10の共重合体、PLGA)を内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm、計0.6mm厚)とし、それにフィブロネクチンを架橋しさらにコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)にHGF融合蛋白を付け処理したPLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜を足場とした。肺動脈主幹部に径20mmのパッチを縫着した。

【0380】

<機械強度>

PLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した(TENSILLON ORIENTEC)。コントロールとしてグルタールアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。<細胞接着の効率>

PLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA))で標識した血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)をフィブロネクチン-HGF架橋処理したPLGA-コラーゲン-HGF複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)のいずれの細胞においてもフィブロネクチン架橋処理したPLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0381】

(実施例6：PGAで血管形状にして用いた実験)

本実施例では、PGAを支持体として用い、コラーゲンI型およびIV型を生体分子として用いて血管を作製し、本発明の効果を実証した。

【0382】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるPGAのメッシュを内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm、計0.6mm厚)とし、それにコラーゲンを架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜を足場とし、人工血管を作製した。コラーゲンを架橋剤としてはコラーゲンI型のみを架橋処理した群、コラーゲンI型にさらにコラーゲンIV型を架橋した群を作製した。架橋処理は、実施例1に記載されるプロトコールに従った。

【0383】

<機械強度>

PLGA-コラーゲン複合人工血管を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した(TENSILLON ORIENTEC)コントロールとしてウーブンダクロンの人工血管を用いて比較検討した。

【0384】

<細胞接着の効率>

PGA-コラーゲン複合人工血管における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA))で標識した血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)をコラーゲンI型のみを架橋処理したPGA-コラーゲン複合人工血管とコラーゲンI型にさらにIV型架橋処理したPGA-コラーゲン複合人工血管で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)のいずれの細胞においてもコラーゲンI型、IV型架橋処理したPGA-コラーゲン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0385】

以上の結果よりコラーゲンI型およびIV型で架橋処理したPGA-コラーゲン複合人工血管が強度も従来の人工血管と同等以上であり、細胞性生着性も高いことから、このPGA-コラーゲン複合人工血管を使用し、事前の細胞播種の効果をインビボにおける検討を行った。

【0386】

(実施例7：フィブロネクチンのコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)とのHGF融合蛋白を心臓に用いた実験)

本実施例では、PLGAを支持体として用い、フィブロネクチンを生体分子として用いてさらにコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)にHGF融合蛋白を付けその組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0387】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるVycrylのポリラクチン910メッシュ(グリコール酸と乳酸の比率が90:10の共重合体、PLGA)を内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm、計0.6mm厚)とし、それにフィブロネクチンを架橋しさらにコラーゲン結合性ドメイン(FNCBD)にHGF融合蛋白を付け処理したPLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜を足場とした。ビーグル成犬(8~10kg)に心筋梗塞を作成し、心筋梗塞部に径20mmのパッチを縫着した。

【0388】

<機械強度>

PLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した(TENSILLON ORIENTEC)。コントロールとしてグルタルアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。

【0389】

<細胞接着の効率>

PLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA)で標識した血管内皮細胞(VECs)および心筋細胞をフィブロネクチン-HGF架橋処理したPLGA-コラーゲン-HGF複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および心筋細胞のいずれの細胞においてもフィブロネクチン架橋処理したPLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0390】

さらに心筋梗塞巣にPLGA-フィブロネクチン-HGF複合膜を移植したところ心筋梗塞巣を再生した心筋が占め、さらに新たな血管が形成されていることが確認できた。これら的心筋細胞はLin-、c-kit+の骨髓間葉系細胞と同様の表現型を有し、自己組織内での臓器再生、組織化が認められた。

【0391】

(実施例8：ラミニンを用いた実験)

本実施例では、PLGAを支持体として用い、ラミニンを生体分子として用いて組織片を調製し、本発明の効果を実証した。

【0392】

(方法・結果)

エキソビボでの実験

<足場設計>

生体分解性合成高分子であるVycrylのポリラクチン910メッシュ(グリコール酸と乳酸の比率が90:10の共重合体、PLGA)を内腔側にニットメッシュ1枚、外側にウーブンメッシュ2枚の計3枚重ね(各0.2mm、計0.6mm厚)とし、それにラミニンを架橋処理したPLGA-ラミニン複合膜を足場とした。肺動脈主幹部に径20mmのパッチを縫着した。

【0393】

<機械強度>

PLGA-ラミニン複合膜を引張試験機で強度測定した。幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷及び弾性率を測定した。(TENSILLON ORIENTEC) コントロールとしてグルタールアルデヒド処理ウマ心膜を用いて比較検討した。

【0394】

<細胞接着の効率>

PLGA-ラミニン複合膜における細胞生着性の確認のため、インビトロにおいて蛍光抗体(PKH-26(SIGMA))で標識した血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)をラミニン架橋処理したPLGA-コラーゲン複合膜で細胞接着効率の比較検討をおこなった。蛍光顕微鏡にて一視野あたりの蛍光色素の発色領域(%)を比較すると血管内皮細胞(VECs)および平滑筋細胞(VSMCs)のいずれの細胞においてもラミニン架橋処理したPLGA-ラミニン複合膜が有意に蛍光色素の発色領域が多く、細胞生着が認められた。

【0395】

(実施例9：支持体の作製：編物および織物の生産)

まず、織物として、ポリL乳酸のメッシュを当該分野において公知の手法を応用して、作製した。その手順は以下のとおりである。糸として240d(デニール)の64f(ファイラメント)のマルチフィラメントを用いた。織り方は、平織りを採用し、径約64本/吋、緯40~47.5本/吋で織った。

【0396】

完成したポリL乳酸メッシュを図13に示す。

【0397】

次に、編物として、ポリグリコール酸を材料として編物を作製した。この編物もまた、公知の手法を応用して、作製した。以下にその手順を示す。糸として約68dの30fマルチフィラメントを用いた。編み方としては、以下の編み方を採用した。

【0398】

組み合わせ

No. 1: AL1, AL2, AL3

No. 2: AL1, AL2, AL3 (No. 1よりL2の送りが多い)

No. 3: BL1, AL2, AL3 (細胞接着実験に用いた)

No. 4: BL1, AL2, AL3 (No. 3よりL3のふり幅を多くした)

No. 5: BL1, AL2, AL3 (No. 4よりL2の送りが多い)

No. 6: BL1, AL2, AL3 (No. 3よりL2のふり幅を多くした)

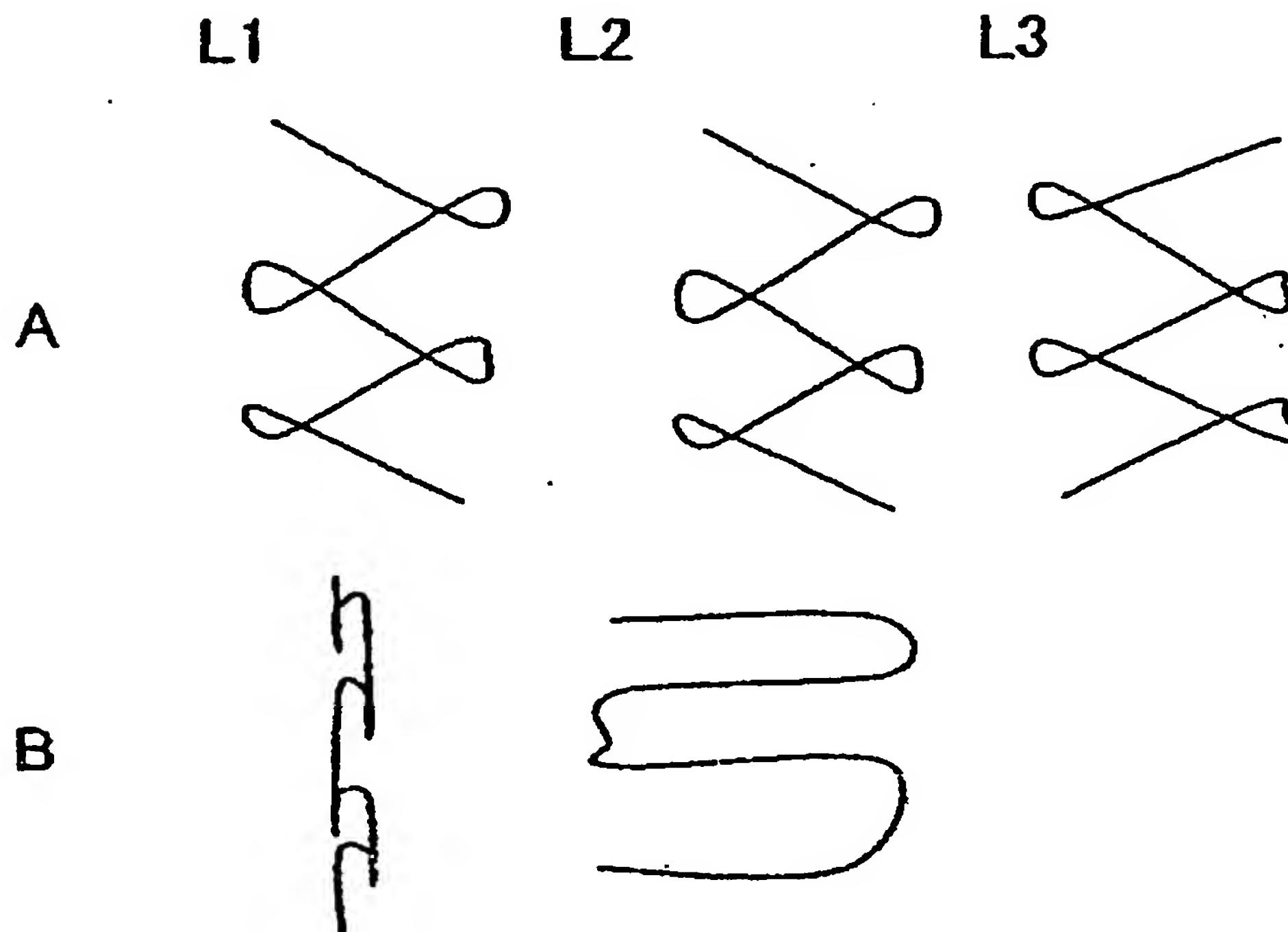
No. 7: BL1, AL2, AL3 (No. 6よりL2の送りが多い)

No. 8: BL1, BL2, AL3

(編み方の例示)

【0399】

【表1】



完成したポリグリコール酸縫物を図14および15に示す。図16には、縫物の断面図を示す。

【0400】

次に、縫物と織物とを中間層としてフィルムを用いて接着させた。その模式的方法を図17および18（詳細図）に示す。

【0401】

フィルムは、ガラス上に材料（ポリ乳酸系フィルム）またはカプロラクタム系の材料をキャストした後に風乾して作製した。

【0402】

次に、織物を下に敷き、その上にこのポリ乳酸系フィルムを敷き、その上に、ポリグリコール酸を置いた。この後、熱処理（80℃～140℃の間）を行い、各々の層を接着させた。

【0403】

この支持体は、移植片として使用することができる。

【0404】

（実施例10：生体分子の付与）

生体分子として、コラーゲン（I型およびIV型）およびラミニンを用いて、実施例9において作製した支持体に生体分子を付与した。その模式図は図18および図19に示される。

【0405】

その後、コラーゲンおよびラミニンを架橋した。架橋方法は実施例1に記載されるとおりである。

【0406】

コラーゲン架橋を行なった後の支持体は図20に示されるようにコラーゲンが付着されていた。織物と縫物とでコラーゲン架橋がどのように異なるかも試みた。その概要は、図21に示す。

【0407】

このようにして、種々の生体分子支持体を作製した。以下に作製した支持体を示す。

1. PGA knit No. 9-PLA woven 横

2. PGA knit No. 9-PLA woven縦
3. PLA woven 47.5横（比較例）
4. PLA woven 47.5縦（比較例）
5. PGA knit No. 9 横
6. PGA knit No. 9 縦

以下の実験では、コントロールとして、ヘマシールド人工血管（Hamshiled PlatinumTM Woven Vascular Grafts、Boston Scientific、MA、USA）およびバスクテック人工血管（Gel sealTM、テルモ、日本）を使用した。

【0408】

（実施例11：生体分子支持体の機能）

次に、実施例10で作製したコラーゲン支持体について、引張り強度、弾性率および伸びを、引張り試験により観察した。その概要を以下に示す。

【0409】

本実施例では、引張試験機（TENSILLON ORIENTEC）で強度測定した。具体的には、幅5mm長さ30mmの短冊状素材を短軸方向に10mm/分の速度で荷重負荷し、破断点負荷および弾性率を測定した。

【0410】

その結果を図22～24に示す。これらの図は、それぞれ、引張り強度、弾性率および伸びを示す。

【0411】

その結果、本発明の支持体は、コントロールとして用いた大動脈血管壁および市販の人工血管と同程度またはそれ以上の強度および弾性率を有することが明らかになった。伸びについても、許容範囲であることがわかった。

【0412】

次に、水漏れ率および通気性を調べた。以下にそのプロトコルを記載する。

【0413】

水漏れ率は、支持体を水平にし、その上に水10mlを垂らし、60秒間でどれだけの量がもれるのかを測定することによって決定した。その結果を図25に示す。本発明の支持体を用いても、血液などの漏れはないであろうことが明らかになった。

【0414】

次に本発明の支持体および他の支持体の通気性を確認した。本実施例では、JIS-H-1096A法を利用した。ここでは、フラジール型試験機に試験片を取り付けた後、加圧抵抗器によって傾斜形気圧計が125Paの圧力を示すように調節し、通過する空気量 (ml/cm²/sec) を測定することによって通気性を決定した。その結果を図26に示す。これまでの実験からイヌに移植したときに血液が漏れないことがわかっているビクリルwovenの2枚重ねをコントロールとして用いた。今回作製した2枚重ねのメッシュは、このコントロールとほぼ同様の通気性を有しており、2.0ml/cm²/sec以下に抑えられていることがわかる。従って、本発明の支持体は、血液を漏らさないことが通気性試験でも確認された。

【0415】

（実施例12：生体分子支持体の細胞接着性）

次に、本発明の生体分子支持体の細胞接着性を確認した。実施例10で作製したものを使用してこの試験を行なった。まず各支持体 (1×1cm²) に血管内皮細胞1×10⁵細胞を播種した。15時間培養後、MTTアッセイを行い、595nmの吸光度を測定した。MTTアッセイの手順は、以下のとおりである。支持体を培養液で洗浄後、MTT溶液を1/10容量加えた培地を用いて、1時間37℃で培養した。この培養後、支持体をPBSで洗浄し、酸性イソプロパノールに加え、10分間振盪させた。その溶液を、マイクロプレートリーダーにより595nmの吸光度を測定することによって、MTTの指標を決定した。

【0416】

MTTは、細胞内のミトコンドリアの脱水素酵素によりテトラゾリウム塩がホルマザンに還元されることに由来する細胞活性の評価法である。ホルマザンについては、生成量と細胞数がよく対応し、また特定波長の吸光特性示すため、試料の吸光度を測定するだけで、容易に生存細胞数の計測が行うことができる。また、細胞内ミトコンドリアの代謝活性を測定するために比較的初期の細胞死を検出することができる。

【0417】

その結果を、15時間の時点での状態として図27に示す。その結果、コラーゲンで架橋をした方が、細胞の接着性が向上していることがわかった。この向上は、他の細胞外マトリクス（例えば、ラミニン、フィブロネクチンなど）でも見出された。また、織物よりも縫物のほうがコラーゲン架橋後の細胞の接着性が高くなることが判明した。

【0418】

また、本発明の支持体に対する細胞の接着性に問題がないことがわかった。

【0419】

(実施例13：接着条件検討)

次に、本発明の支持体の接着の際の条件検討を行なった。

【0420】

ポリL乳酸織物と、ポリグリコール酸織物との間にカプロラクタムフィルムを中間層として用いて、種々の接着条件を検討した。カプロラクタムフィルムは、5%カプロラクタム/ジオキサン溶液を300μmの厚さでガラス上にキャストし、その後風乾して作製した。作製方法を、図28に示す。

【0421】

次に、接着強度を実施例11に示されるのと本質的に同様に行なった。その結果を図29に示す。その結果、約80℃～140℃、すなわち中間層の融点より高く第一層および第二層の融点よりも低い温度において、強度で顕著な向上が見られた。従って、本発明の支持体を製造するためには、この温度前後を採用することが好ましい。この場合、最も10分間の処理をすることが望ましいことが明らかになった。

【0422】

(実施例14：強度劣化試験)

次に、インビトロでの強度劣化試験を行なった。

【0423】

生体内での移植期間に対するPGA系の強度劣化を予測するために、分解試験を行なった。方法としては、本発明の支持体とDexonメッシュ（コントロール）とをPBS中37℃で放置し、1、3および6週間後に外見、重さおよび引張り強度を観察した。その変化の様子を図30に示す。各々の数値をグラフ化したものを図31に示す。

【0424】

図31からも明らかかなように、3週間たつとほとんど強度がなくなっていた。生体内でもこのアッセイとほぼ同じ分解がする無とされており、移植後3週間で強度がなくなるようである。

【0425】

(実施例15：他の細胞外マトリクス)

次に、コラーゲンに加えて、他の細胞外マトリクスでも同様の支持体が作製されるかどうかを確認した。

【0426】

細胞外マトリクスとしては、コラーゲンI型、IV型およびラミニンを用いた。細胞としては、血管内皮細胞および平滑筋細胞を用いた。アッセイとしては、上記MTTアッセイを用いた。

【0427】

今回作製した支持体は、充分な強度を有していた（本発明の支持体：101.4N、成体イヌ大動脈壁：5.4N、従来の人工血管（ヘマシールドおよびGel seal）：1

01. 4 N)。

【0428】

通気性試験を上記同様に行なったところ、本発明の支持体：2. 1、織物：5. 1、編物：142. 3（単位は $m l / cm^2 / sec$ ）であった。

【0429】

細胞接着性試験もまた上記実施例と同様に行なった。ところ、織物：0. 116±0. 005、編物（コラーゲンスponジあり）：0. 398±0. 008、および本発明の支持体：0. 402±0. 035であった。従って、コラーゲンスponジを導入することによって、有意に細胞生着性が改善した。

【0430】

細胞接着性は、I型コラーゲンのとき、内皮細胞：0. 145±0. 053／平滑筋細胞：0. 286±0. 032；IV型コラーゲンのとき、内皮細胞：0. 159±0. 056／平滑筋細胞：0. 252±0. 016；ラミニンのとき、内皮細胞：0. 146±0. 017／平滑筋細胞：0. 251±0. 014と、ほとんどの細胞外マトリクスで、同様に有効であることが明らかになった。

【0431】

従って、このように本発明の支持体は、自己組織再生による心血管および他の組織修復パッチとして充分な強度を有し、血液漏出も少なく、細胞生着性の高い、心血管および他の組織修復支持体として、臨床応用を行うことができる。

【0432】

（実施例16：インビボ試験）

実施例10で作製された本発明の支持体（コラーゲンなしおよびコラーゲン付与；15mm×10mm）を、ビーグル成犬（8-12kg）の肺動脈主幹部に部分遮断下に移植した。移植後、2週、2ヶ月、6ヶ月後に摘出し、組織学的に検討した。

【0433】

＜インビボ：移植2週間後＞

移植した支持体には肉眼的に明らかな血栓形成は認められなかった。HE染色では、支持体の残存が認められ、その間には結合織が介在していた。

【0434】

＜インビボ：移植2ヶ月後＞

移植した支持体の内腔側表面は肉眼的に平滑であり、HE染色によって、PLGAは完全に吸収されており、正常の血管として遜色のない組織構造であることが明らかになった。

【0435】

血管内被細胞を第VIII因子染色により、平滑筋細胞を α -平滑筋アクチン（ α -SMA）免疫染色にて検討した。 α -SMA免疫染色は、 α -SMAに対する抗体を用いて染色を行った。第VIII因子免疫染色で单層の連続する血管内皮細胞が認められ、 α -SMA免疫染色で内腔側に配向性を有する平滑筋細胞が認められた。

【0436】

さらに、エラスチカ・ファン・ギーソン染色にて、血管の弾性線維を検討した。血管内層に弾性線維の発現が認められた。

【0437】

＜インビボ：移植後6ヶ月後＞

移植後2ヶ月目に見られたのと同様に、第VIII因子免疫染色で单層の連続する血管内皮細胞が認められた。平滑筋細胞は、移植後2ヶ月目に見られたよりもさらにその形態を明らかにし、 α -SMA免疫染色で内腔に配向性を有し、正常血管とほぼ同様であった。エラスチカ・ファン・ギーソン染色において血管弾性線維も移植後に見られたよりも血管内層に弾性線維の発現がより多く認められた。さらに、血管の石灰化の有無は、フォンコッサ染色により、移植した支持体および周辺血管には陽性反応が認められなかつたことから、石灰沈着は認められなかつた。

【0438】

(実施例17：心臓への移植)

次に、実施例10で作製された支持体（コラーゲンなしおよびコラーゲン付与）をラット梗塞心に移植した。

【0439】

<心筋梗塞ラットモデル>

雄性Lewis系統ラットモデルを本実施例において用いた。National Society for Medical Researchが作成した「Principles of Laboratory Animal Care」およびInstitute of Laboratory Animal Resourcesが作成、National Institute of Healthが公表した「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」（NIH Publication, No. 86-23, 1985, 改訂）に遵って、動物愛護精神に則った世話を動物に対して行った。

【0440】

急性心筋梗塞を、Weissman HF et al., (Circulation, 1988; 78:186-201) に記載されるように誘導した。簡潔には、ラット（300g、8週齢）をペントバルビタールなトリウムで麻酔し、陽圧式呼吸を行った。ラットの心筋梗塞モデルを作製するために、左第四肋間で胸郭を開き、左冠動脈を根元から3mmの距離で、8-0ポリプロピレン糸で完全に結紮した。

【0441】

<支持体の移植>

心筋梗塞ラットを麻酔し、左第五肋間で胸郭を開いて心臓を露出させた。このラットを心筋梗塞領域に投与した物質に従って2群に分けた：C群（無治療群、n=5）と、S群（支持体移植群、n=5）。支持体は、左前下降枝結紮2週間後に梗塞部位に直接移植した。

【0442】

<ラット心臓の心機能の測定>

梗塞モデル作製2週間後、移植後4週間後、同8週間後に、心臓超音波（SONOS 5500、Agilent Technologies社製）を用いて心機能を測定した（図32参照）。12MHzのトランス（transducer）を用いて、左側方より左室が最大径を示す位置にて短軸像を描出した。Bモード（B-mode）にて、左室収縮末期面積（end systolic area）、Mモード（M-mode）にて左室拡張末期径（LVDd）、左室収縮末期径（LVDs）、および左室前壁厚（LVAW Th）を測定し、左室駆出分画（LVEF）および左室内径短縮率（LVFS）を算出した。

【0443】

<組織学的分析>

本発明の支持体の移植後、4週間後、8週間後に心臓を摘出し、短軸にて切断し、10%ホルムアルデヒド溶液に浸し、パラフィン固定を行った。切片を作製し、ヘマトキシリニーエオジン染色、マッソントリクローム染色を行った。マッソントリクローム染色は以下のように行った。また、同時期の凍結切片を作製し、第VIII因子免疫染色を行った（図32参照）。

【0444】

<マッソントリクローム染色>

マッソントリクローム染色法は以下のとおりである：マッソントリクローム染色では、鉄ヘマトキシリニで核が染められ、その後に拡散速度の大きい小色素分子（酸フクシン、ポンソーキシリジン）が細胞の細網孔へ浸透し、次いで拡散速度の小さい大色素分子（アニリン青）が膠原線維の粗構造に入り込み青色に染め出す。

【0445】

マッソントリクローム染色で使用される試薬

A) 媒染剤

10%トリクロル酢酸水溶液	1容
10%重クロム酸カリウム水溶液	1容

B) ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液 (使用時に1液と2液を等量混合)

1液

ヘマトキシリン	1g
100%エタノール	100ml

2液

塩化第二鉄	2.0g
塩酸 (25%)	1ml
蒸留水	95ml

C) 1%塩酸70%アルコール

D) I 液

1%ビーブリッヒスカーレット	90ml
1%酸性フクシン	10ml
酢酸	1ml

E) II液

リンモリブデン酸	5g
リンタンクスチレン酸	5g
蒸留水	200ml

F) III液

アニリン青	2.5g
酢酸	2ml
蒸留水	100ml

G) 1%酢酸水

マッソントリクローム染色法の手順

1. 脱パラ、水洗、蒸留水
2. 媒染 (10~15分)
3. 水洗 (5分)
4. ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液 (5分)
5. 軽く水洗
6. 1%塩酸70%アルコールで分別
7. 色出し、水洗 (10分)
8. 蒸留水
9. I 液 (2~5分)
10. 軽く水洗
11. II液 (30分以上)
12. 軽く水洗
13. III液 (5分)
14. 軽く水洗
15. 1%酢酸水 (5分)
16. 水洗 (すばやく)
17. 脱水、透徹、封入。

【0446】

マッソントリクローム染色法では、膠原線維、細網線維、糸球体基底膜は、鮮やかな青に染まり、核は黒紫色に染まり、細胞質は淡赤色に染まり、赤血球は橙黄色~深紅色に染まり、粘液は青色に染まり、細胞分泌顆粒は好塩基性が青に好酸性が赤に染まり、線維素は赤に染まる。従って、青く染まった面積を線維化した部位として算出することができる。本明細書において、特定のサイトカインおよび増殖因子の処置後、線維症化した面積が

統計学的に有意に減少しているか否かを判定することにより、抗線維化作用を判定することができる。

【0447】

＜結果＞

移植の4週間後、心エコー検査を行ったところ、S群における駆出率および左室短縮率は、C群に比較して有意な改善を示した。これらの機能改善は、移植後少なくとも8週間までは維持されていた。

【0448】

＜組織学的評価＞

S群は、C群と比較して、LV壁の厚みにおける有意な増加およびLV断面積の減少を示した。顕微鏡検査では、新たに形成された心臓組織が、LV壁のうちの梗塞を起こした領域を補うことを見出した。具体的な図を、図33～35に示す。図33は、コントロール（移植なし）の図34および35と同じ時期での様子を示し、図34は、本発明の支持体（生体分子付与なし）の移植後1ヶ月の様子を示し、図35は、本発明の支持体（コラーゲンIV型およびI型付与）の移植後1ヶ月の様子を示す。示されるように、本発明の支持体では、血管の新生および支持体（パッチ）の消長が見られた。この傾向は、図35に示されるように、コラーゲンIV型およびI型付与支持体においてより顕著であった。

【0449】

従って、本発明の支持体は、細胞など生体に由来する自己増殖性のものを用いることなく、自己化する組織片を提供することを実証した。また、支持体単独でもそのような効果が見出されたことから、従来の縫物、織物において見出された欠点が克服された生体適合性支持体が提供されることが実証された。

【0450】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0451】

本発明により、細胞など生体に由来する自己増殖性のものを用いることなく、自己化する組織片が提供された。そのような組織片を移植することで、臓器または組織の再生がみられたことはかつてなく、そのような再生医療産業において本発明は特に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0452】

【図1】図1は、本発明の生体適合性組織片の一例である。

【図2】図2は、移植の様子を示す写真である。

【図3】図3は、機械的強度を示すグラフである。

【図4】図4は、インビトロでの細胞接着効率を示す図である。

【図5】図5は、インビトロでの移植2週間後の様子を示す図である。

【図6】図6は、インビトロでの移植2ヶ月後の様子を示す図である。

【図7】図7は、インビトロでの移植2ヶ月後の血管内皮細胞様子を示す図である。

【図8】図8は、インビトロでの移植2ヶ月後の血管平滑筋細胞様子を示す図である。

【図9】図9は、インビトロでの移植2ヶ月後の弾性線維細胞様子を示す図である。

【図10】図10は、インビトロでの移植6ヶ月後の様子を示す図である。

【図11】図11は、インビトロでの移植6ヶ月後の様子を示す別の図である。

【図12】図12は、インビトロでの移植6ヶ月後の石灰化の様子を示す図である。

【図13】図13は、ポリL乳酸のメッシュの上面からの撮影写真である。

【図14】図14は、ポリグリコール酸縫物の下面からの撮影写真である。

【図15】図15は、ポリグリコール酸縫物を上から取った写真である。

【図16】図16は、ポリグリコール酸繊物の断面図である。輪が連続して結合されている様子がわかる。

【図17】図17は、ポリグリコール酸繊物と、ポリL乳酸繊物とを接着させる方法の模式図である。

【図18】図18は、本発明の支持体の作製法を示す。

【図19】図19は、コラーゲン架橋の概略図である。

【図20】図20は、コラーゲン架橋された支持体例を示す。

【図21】図21は、コラーゲン架橋を種々の支持体に施した例を示す。

【図22】図22は、各種支持体の引張り強度を示す。

【図23】図23は、各種支持体の弾性率を示す。

【図24】図24は、各種支持体の伸びを示す。

【図25】図25は、各種支持体の水漏れ率を示す。

【図26】図26は、各種支持体の通気性を示す。

【図27】図27は、インビトロでの細胞接着性を示す。

【図28】図28は、接着条件検討試験での試験プロトコール例を示す。

【図29】図29は、接着条件試験の結果を示す。

【図30】図30は、強度劣化試験の結果（0、1、3および6週間後）を表面形状で示す。

【図31】図31は、強度劣化試験に関し、重量変化（A）、最大点荷重の変化（B）、および最大点荷重変化の割合（C）の結果を示す。

【図32】図32は、ラット心臓への本発明の支持体の移植の手順の模式図を示す。

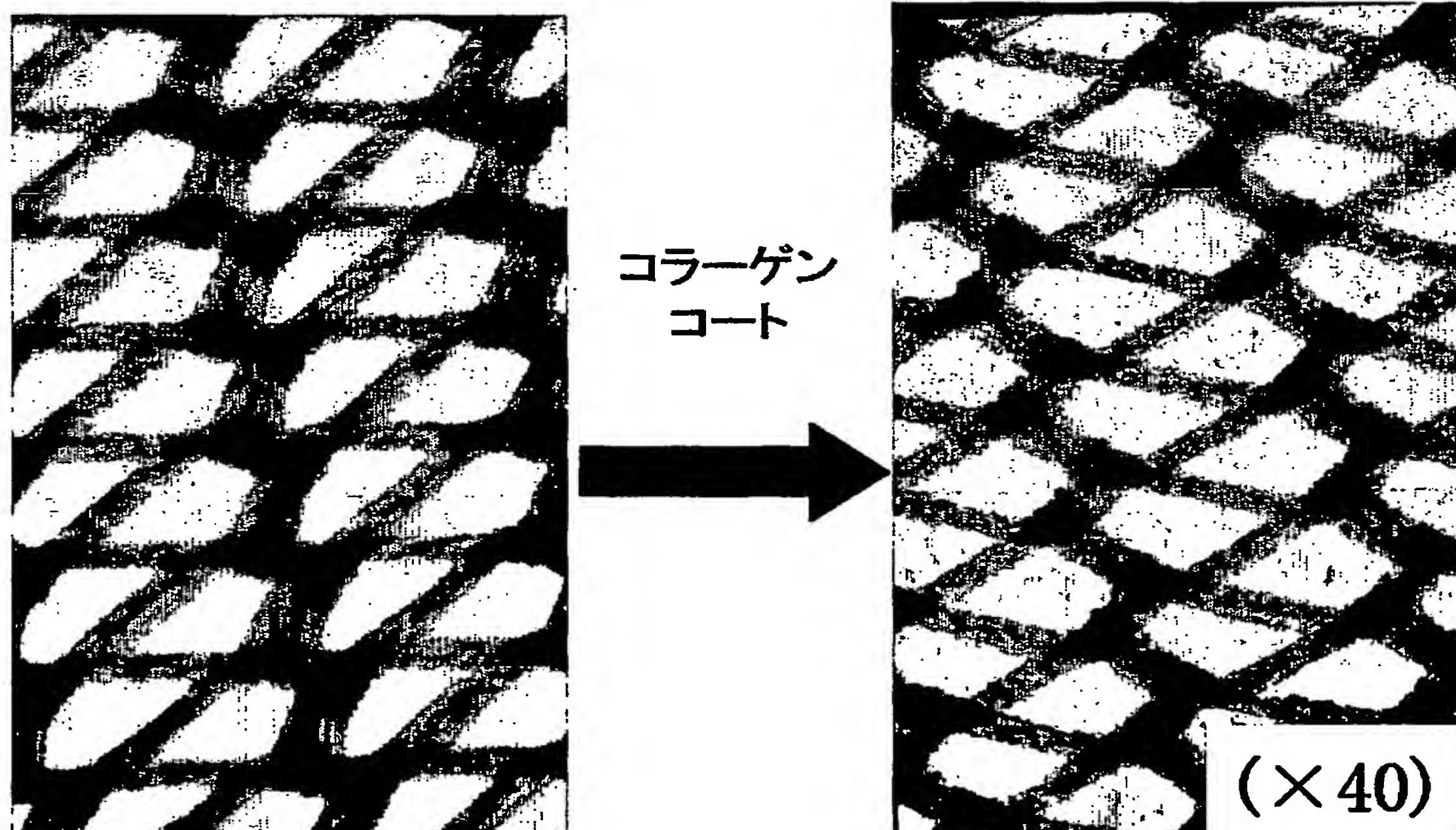
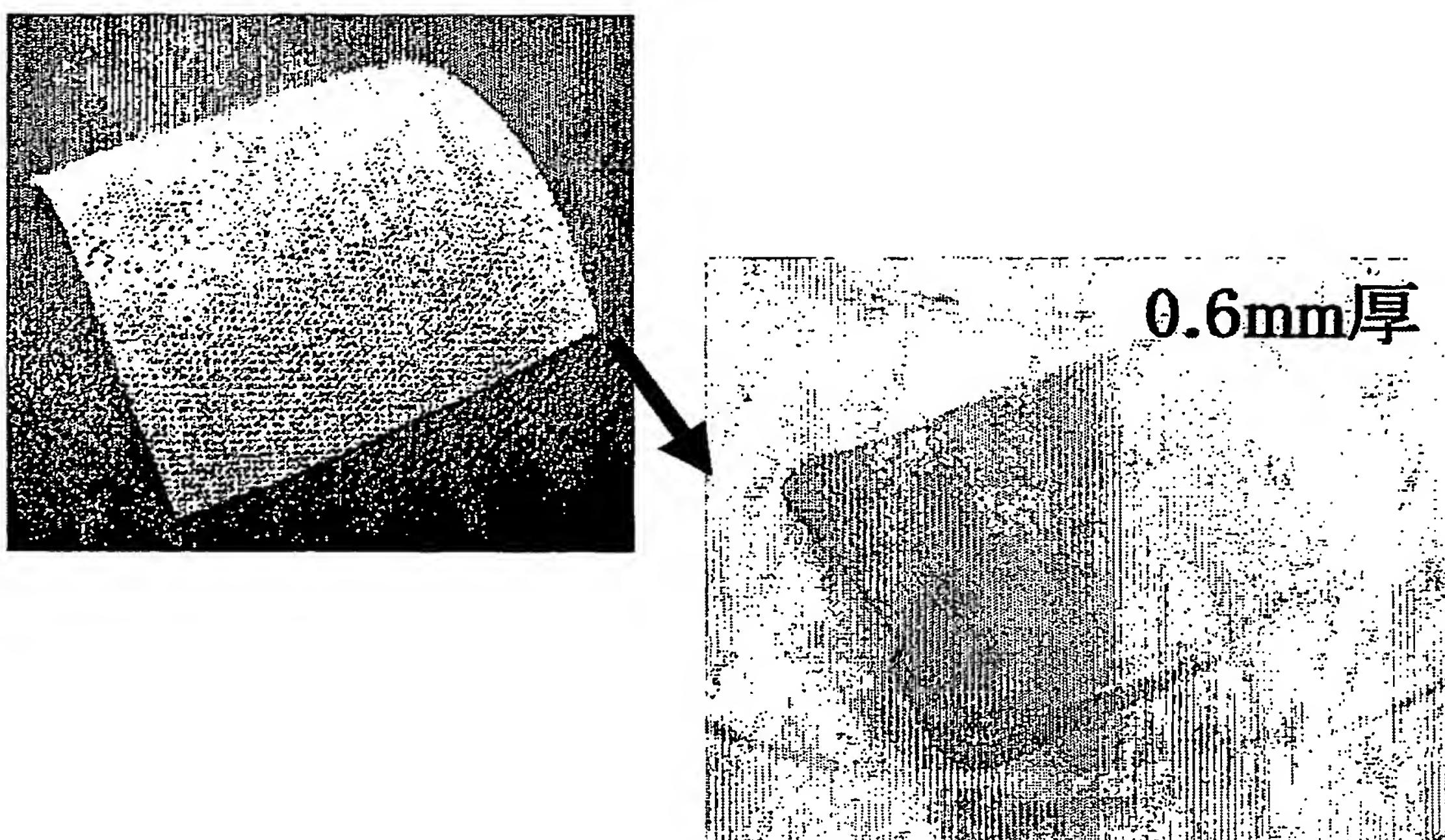
【図33】図33は、ラット心臓の支持体移植なしの場合の梗塞後1ヶ月の様子を示す。

【図34】図34は、本発明の支持体（生体分子付与なし）の移植後1ヶ月の様子を示す。

【図35】図35は、本発明の支持体（コラーゲンIV型およびI型付与）の移植後1ヶ月の様子を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

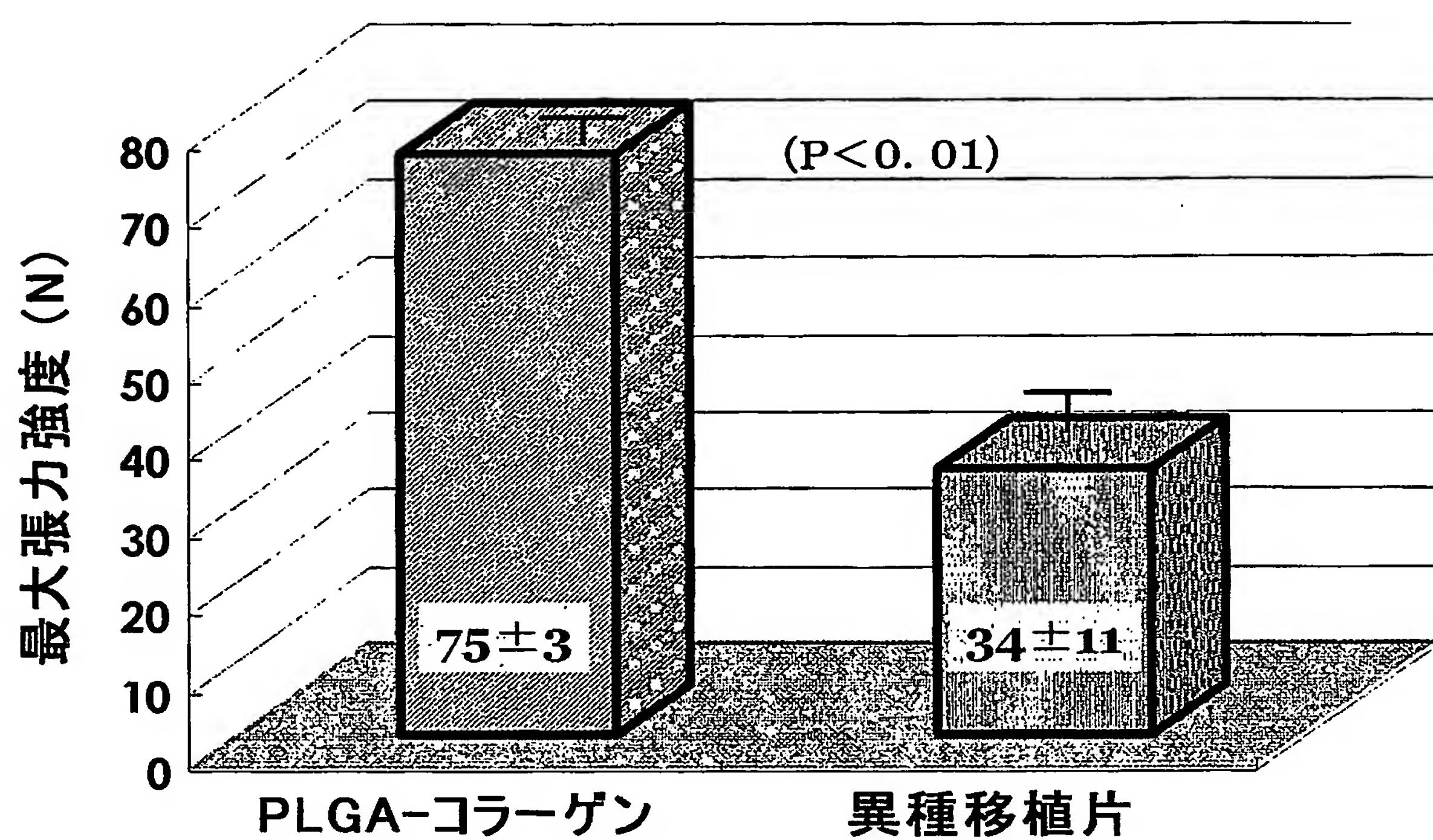


【図2】



【図3】

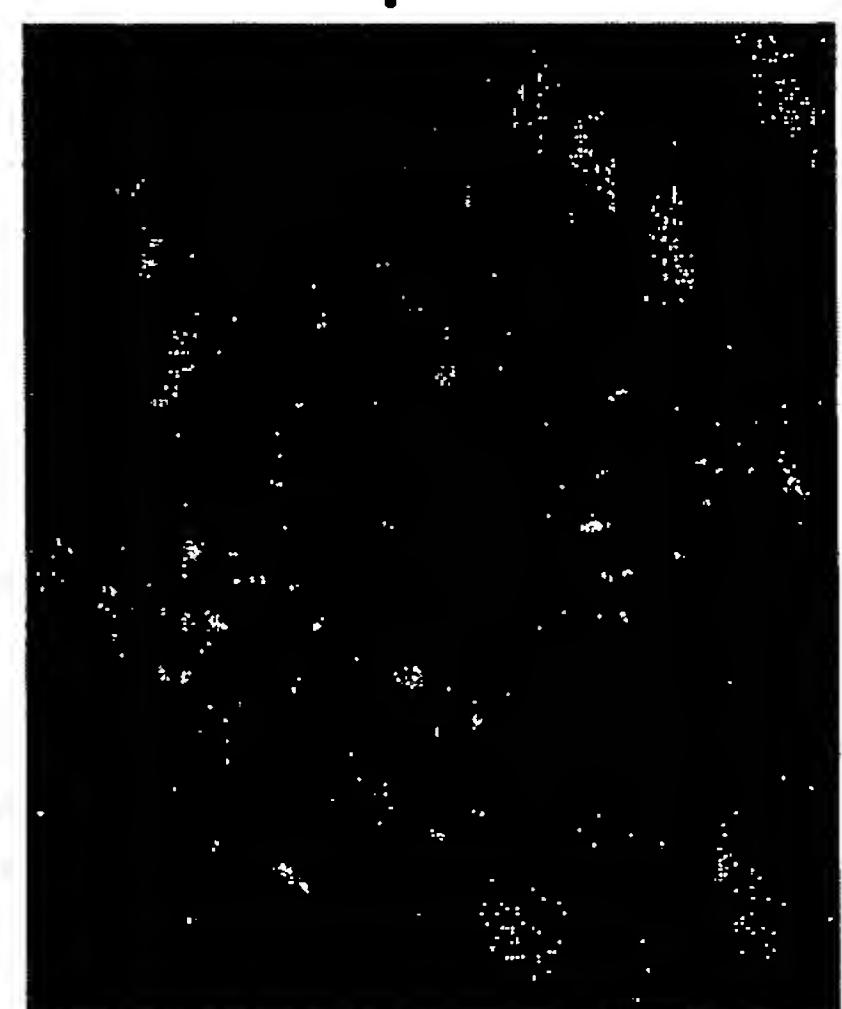
<機械的強度>



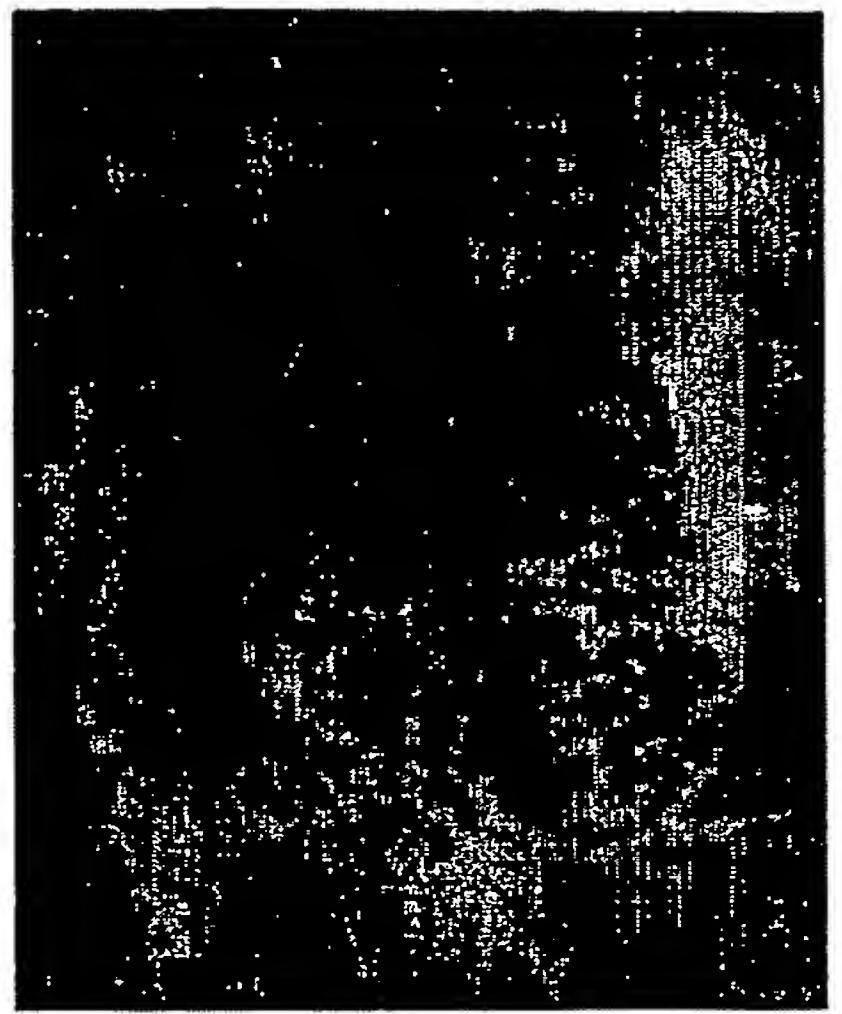
【図4】

<イハンビトロ：細胞接着効率>

#細胞播種7日後
コラーゲン型のみ
コラーゲン型



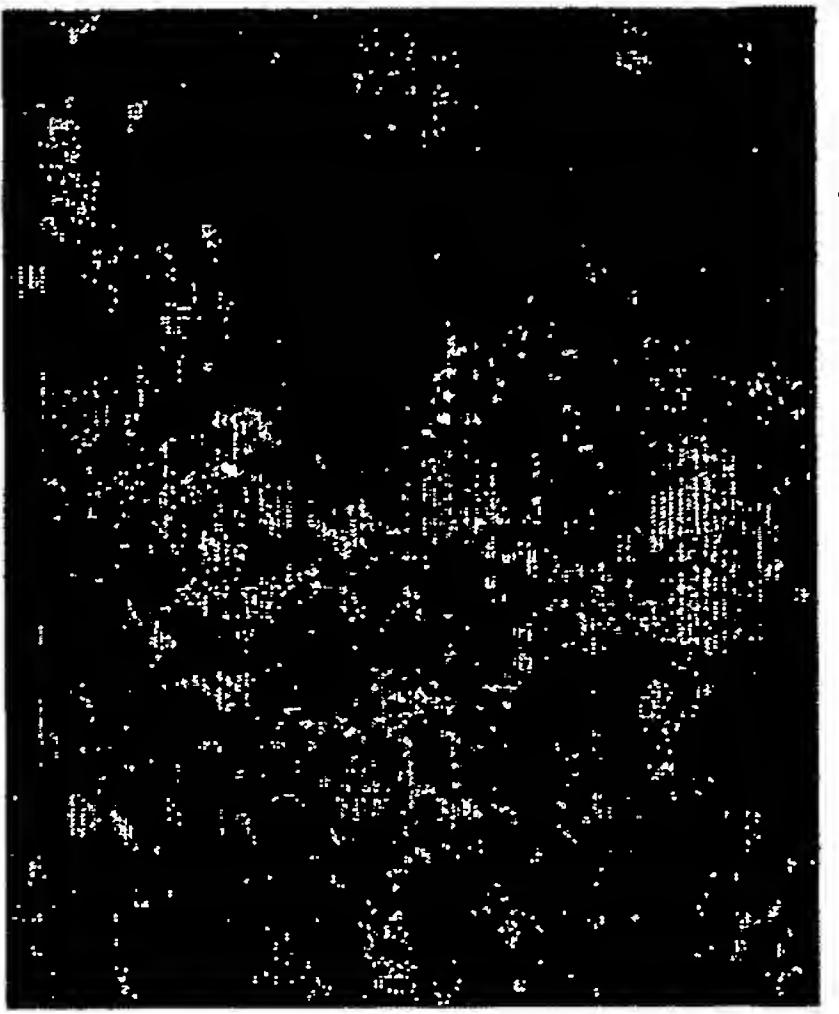
VECs播種

-(P<0.01)-
(29±10%)

(55±11%)

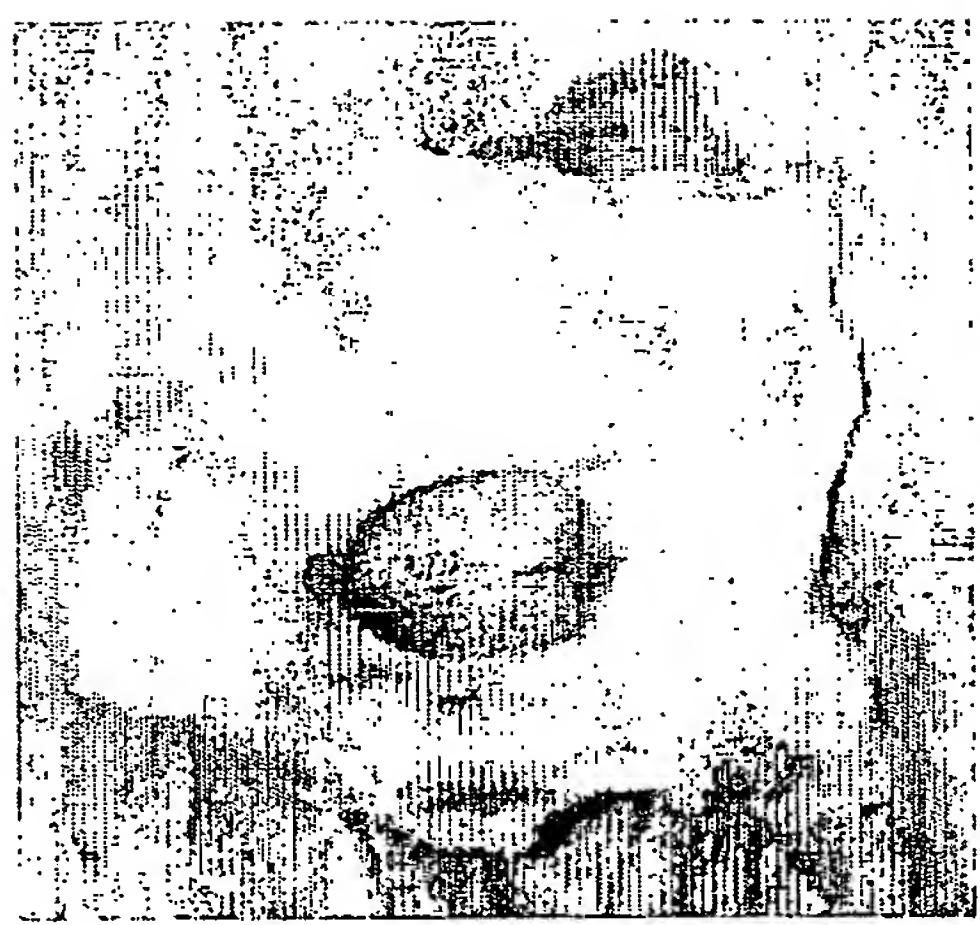


VSMCs播種

-(P<0.01)-
(40±6%)

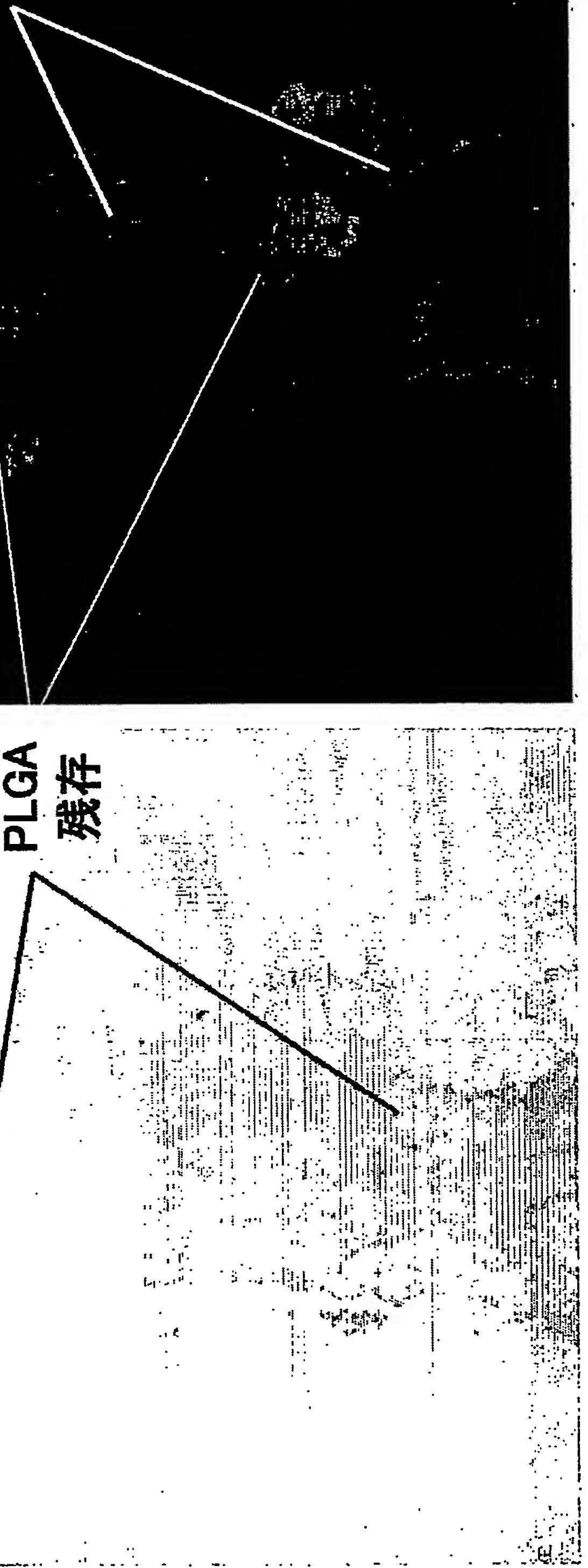
【図5】

(イシビボ：移植2週後)



(HE x40)

(PKH26 x40)

PLGA
残存播種前
細胞

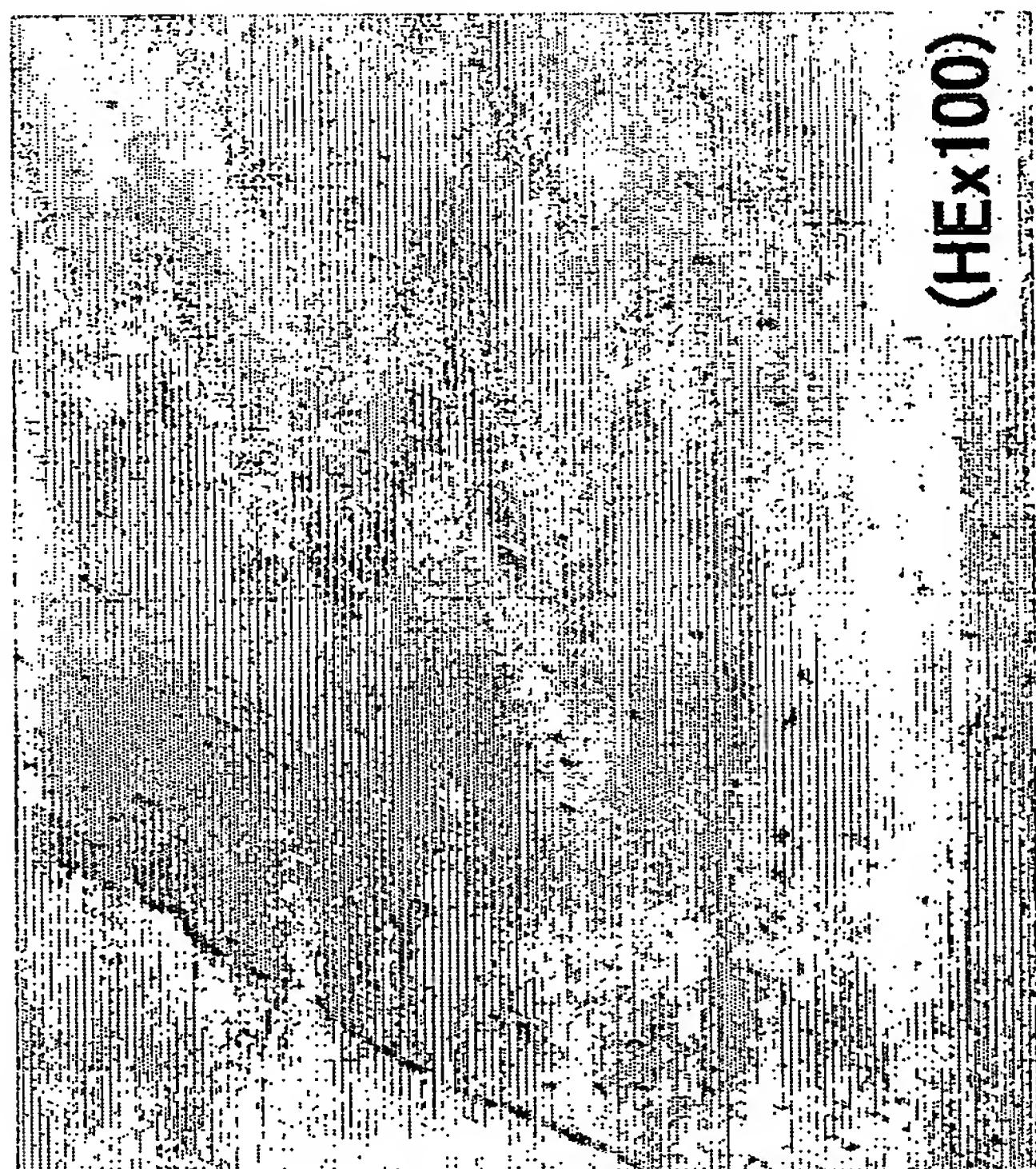
【図6】

(インビボ：移植2ヶ月後)

内腔面平滑
血栓付着(−)



細胞播種(+) 細胞播種(−)



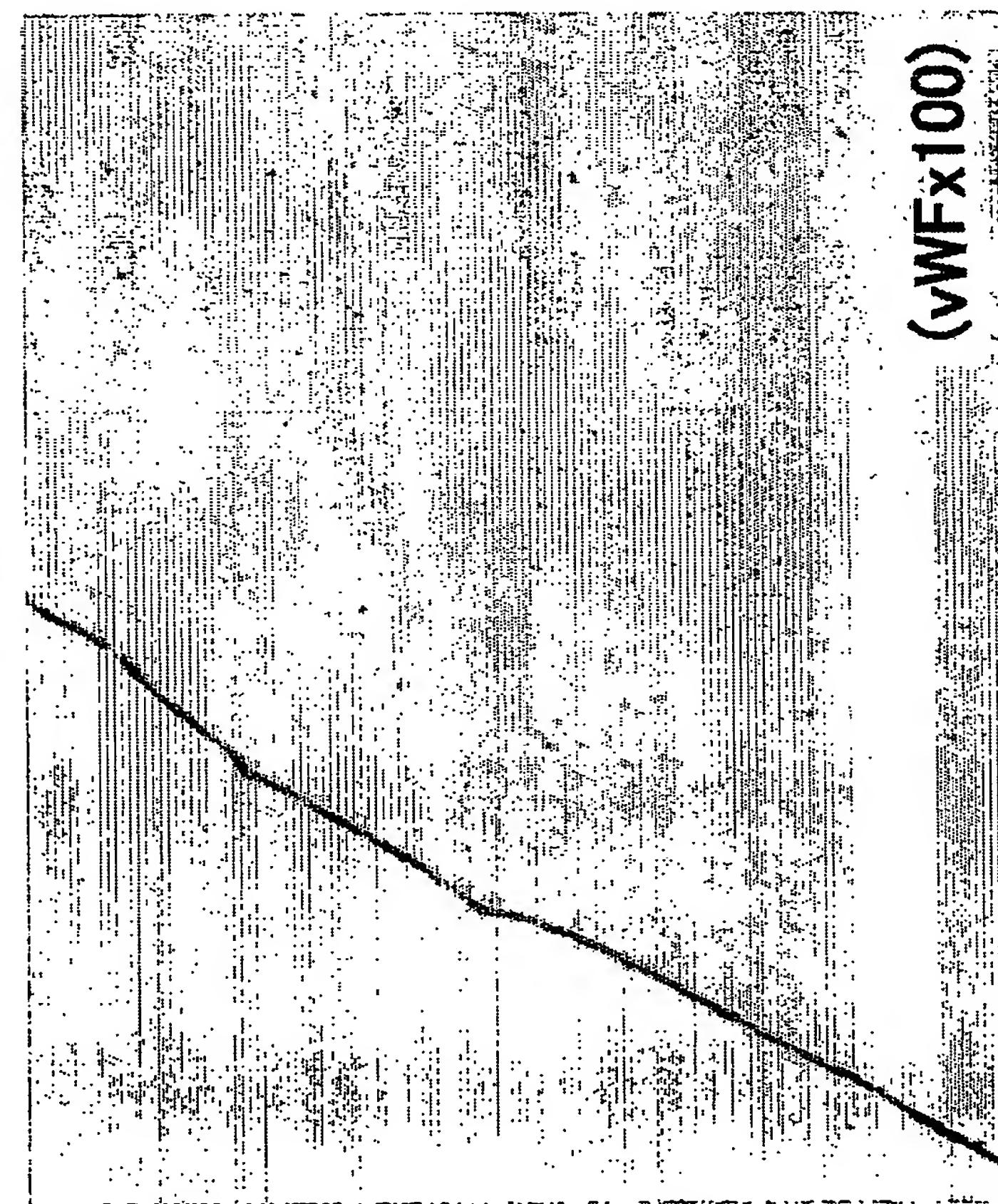
(HEx100)

(HEx100)

〔図7〕

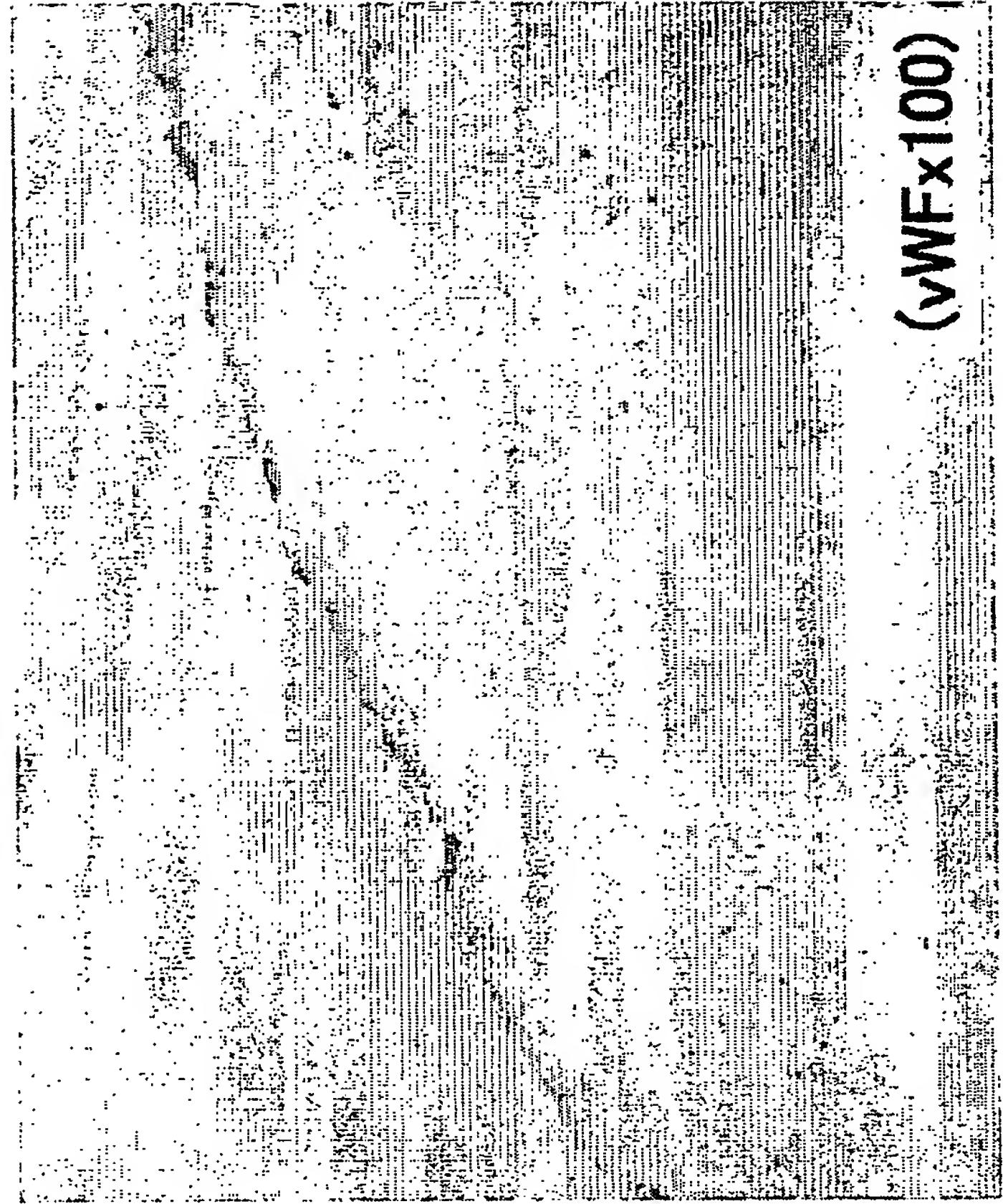
(イシノビボ：移植2ヶ月後；血管内皮細胞)

細胞播種 (+)



(vWFx100)

細胞播種 (-)



(vWFx100)

有意な差はない

【図8】

(インビオ:移植2ヶ月後;血管平滑筋細胞)

細胞播種 (+)

細胞播種 (-)

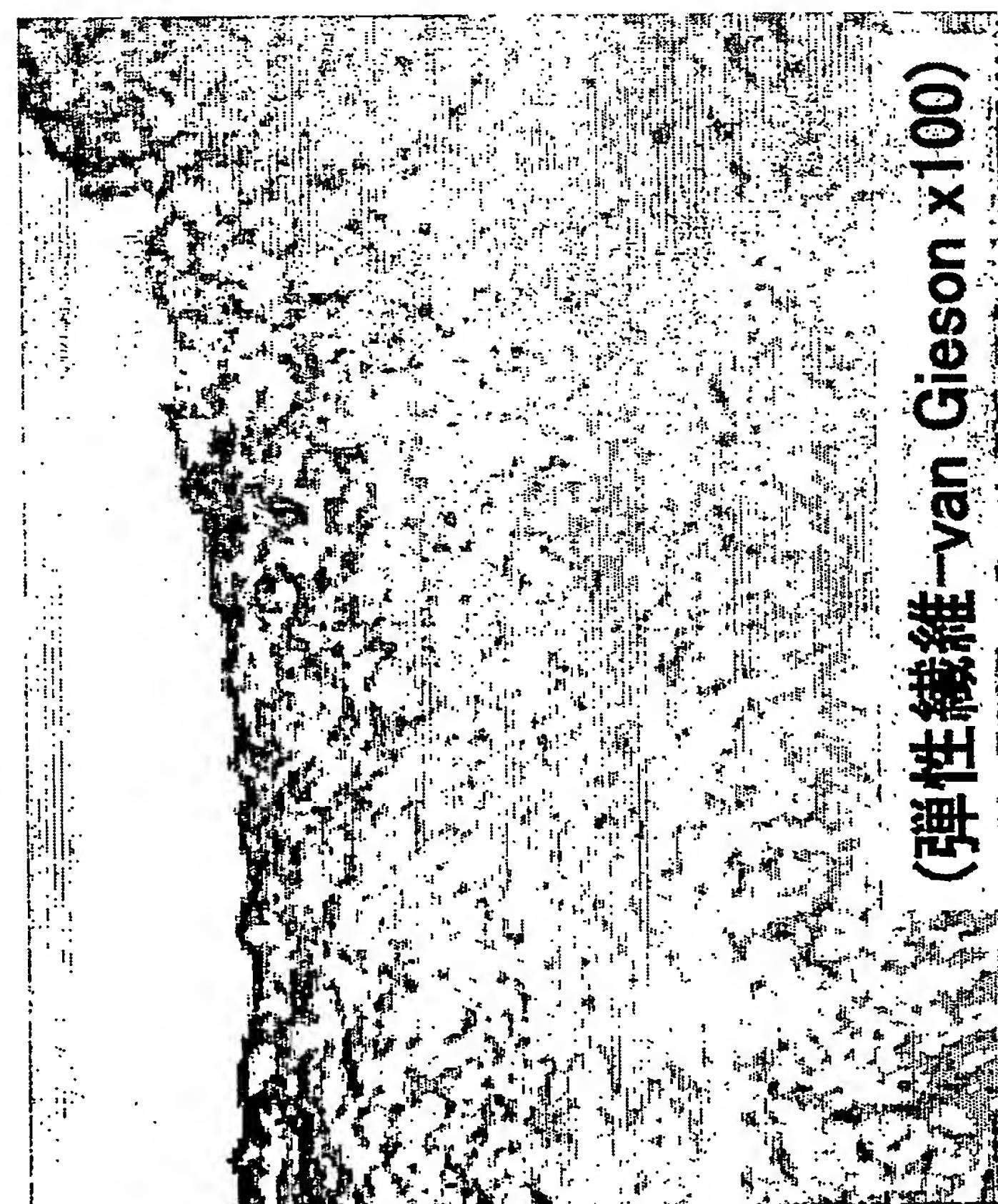
 $(\alpha\text{-SMA}200)$ $(\alpha\text{-SMA}200)$

有意な差はない

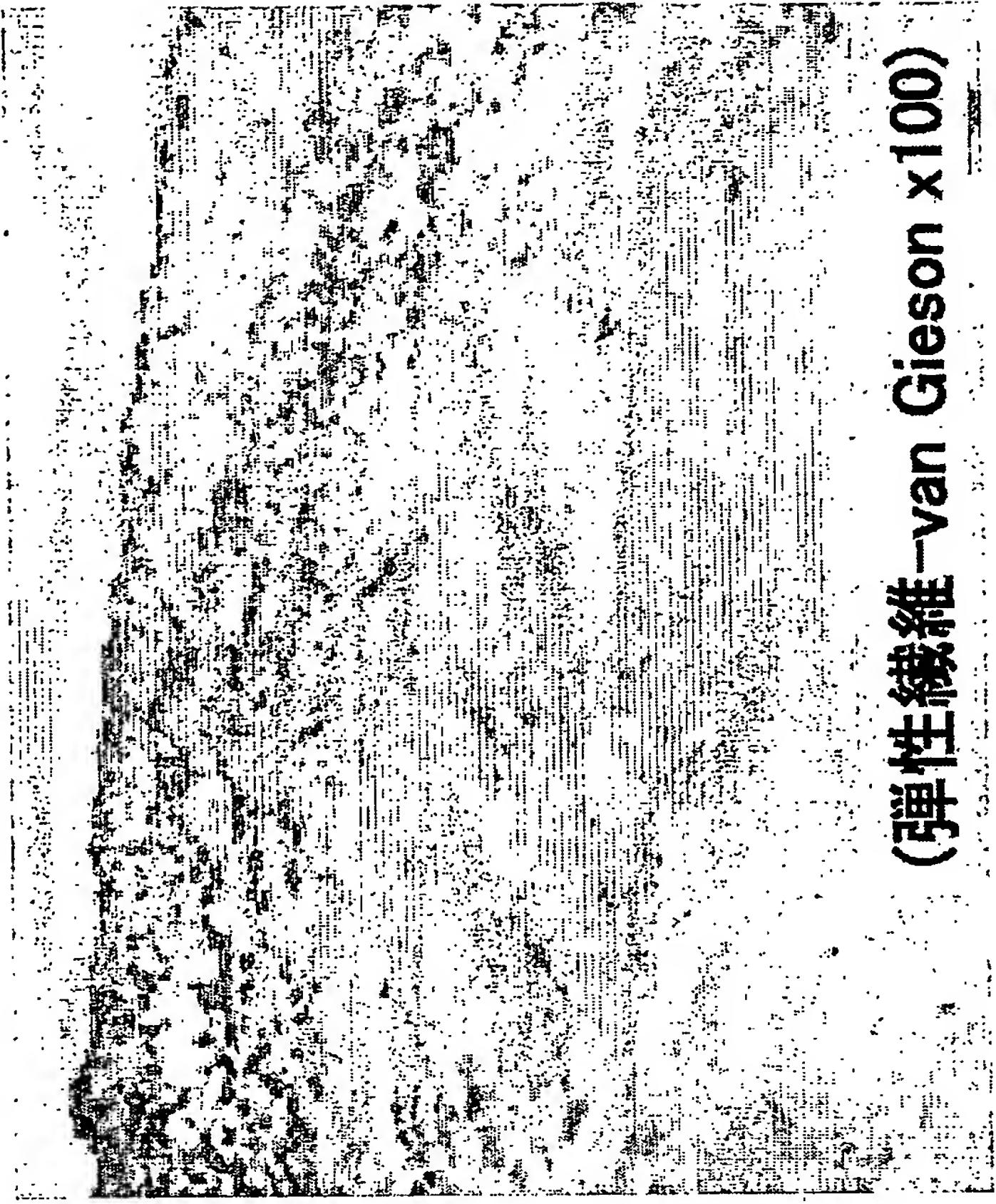
〔図9〕

(ハンビボ:移植2ヶ月後;弾性線維)

細胞播種 (+)

(弾性線維-van Gieson $\times 100$)

細胞播種 (-)

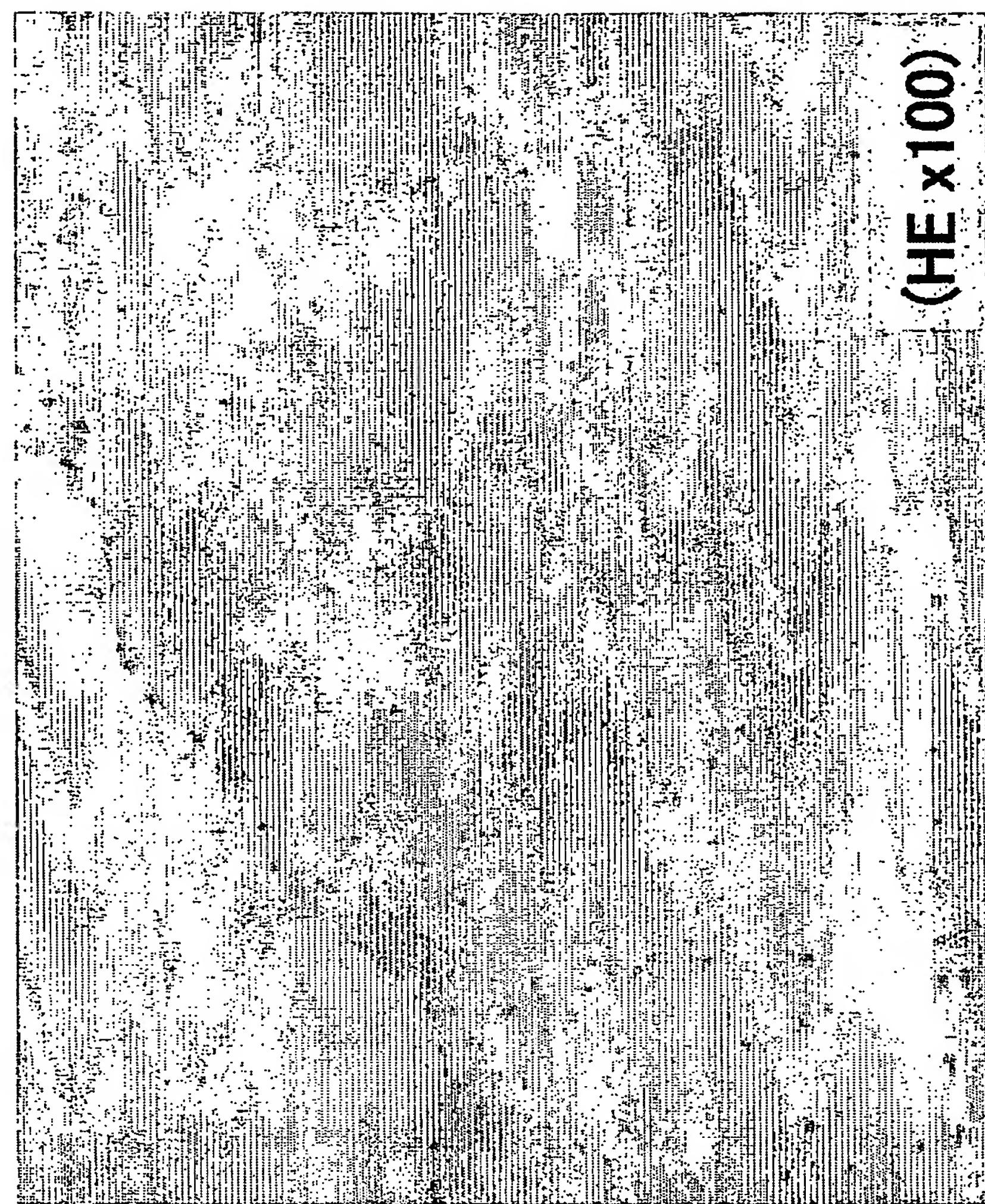
(弾性線維-van Gieson $\times 100$)

有意な差はない

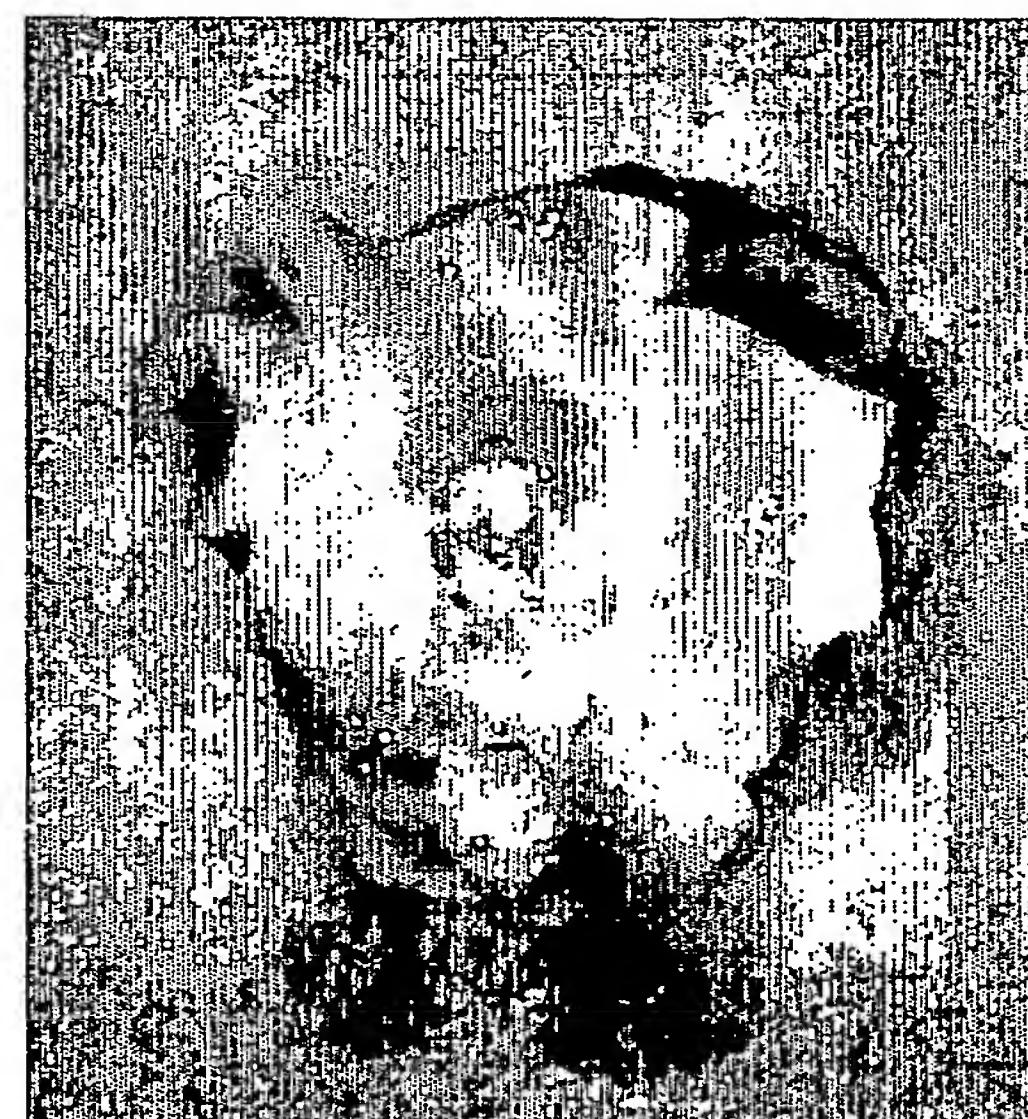
【図10】

(インビボ：移植6ヶ月後)

細胞播種 (一)

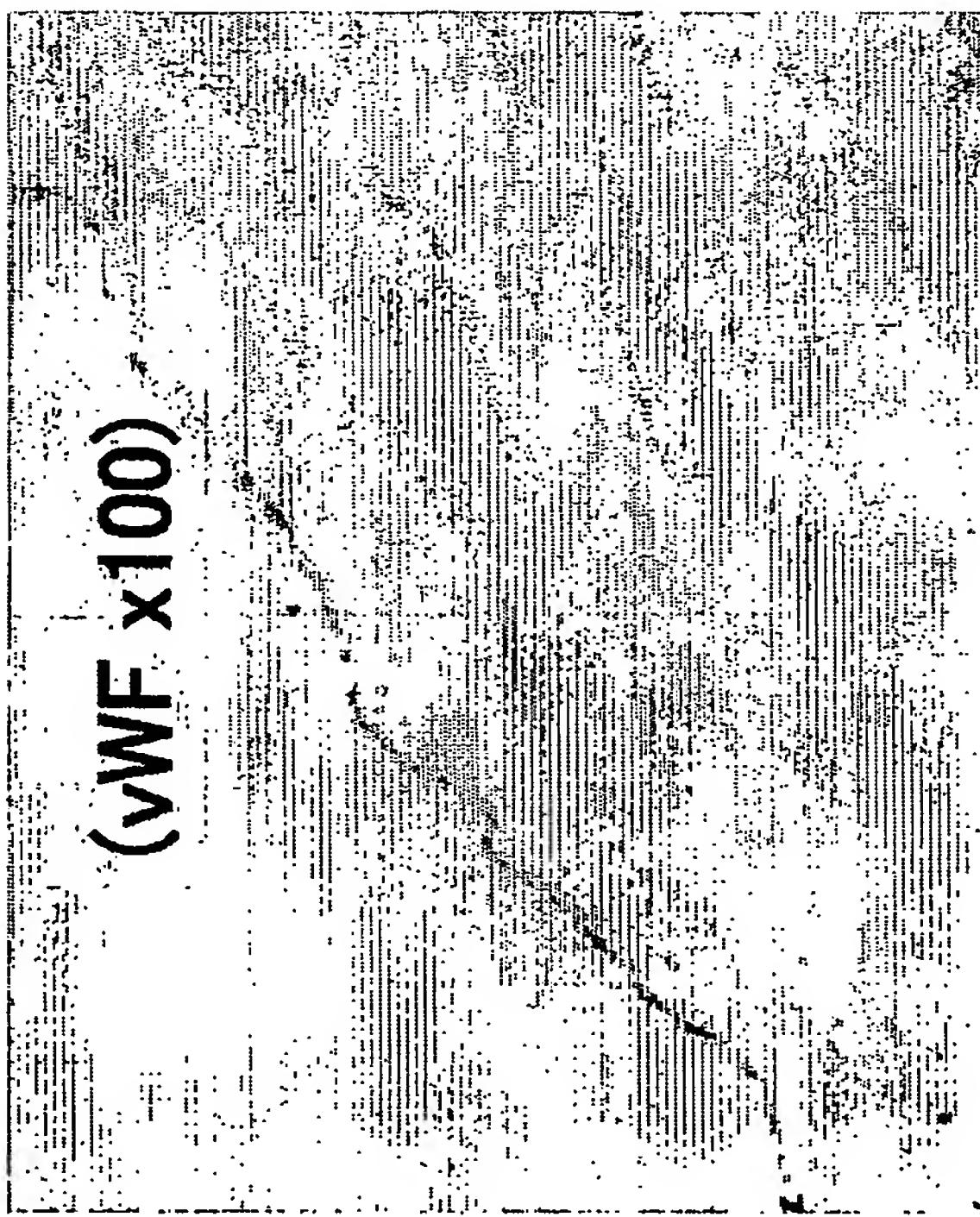


内腔面平滑
血栓付着(一)



【図11】

(イノビド：移植6ヶ月後)

 $(\alpha\text{-SMA} \times 200)$ 

单層の血管内皮細胞 (弹性纖維-van Gieson x100)



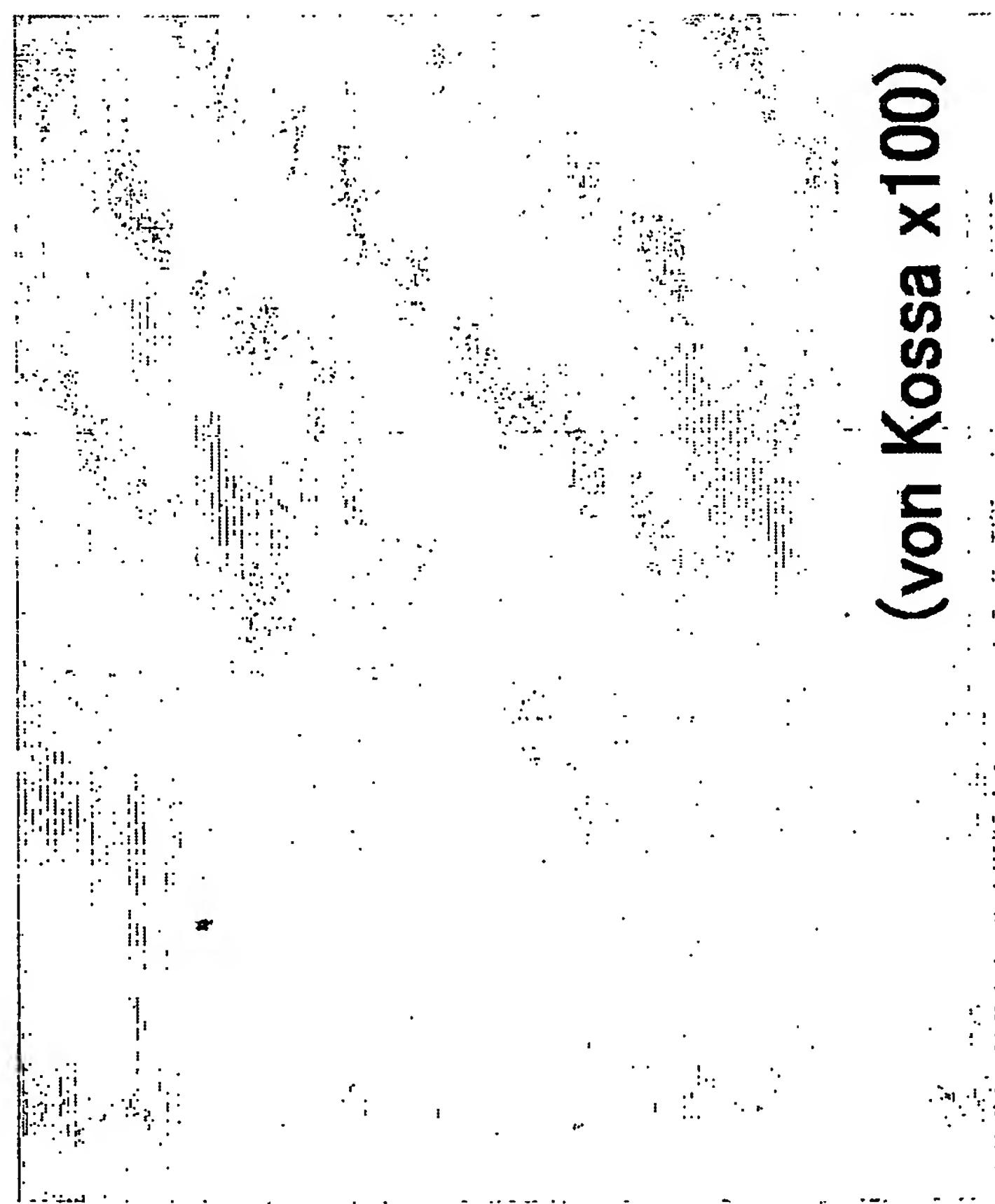
弹性線維 ↑↑

【図12】

(イシビボ：移植6ヶ月後；石灰化)

PLGA-コラーゲン

ゲルコースアルテビドの
異種移植片あり



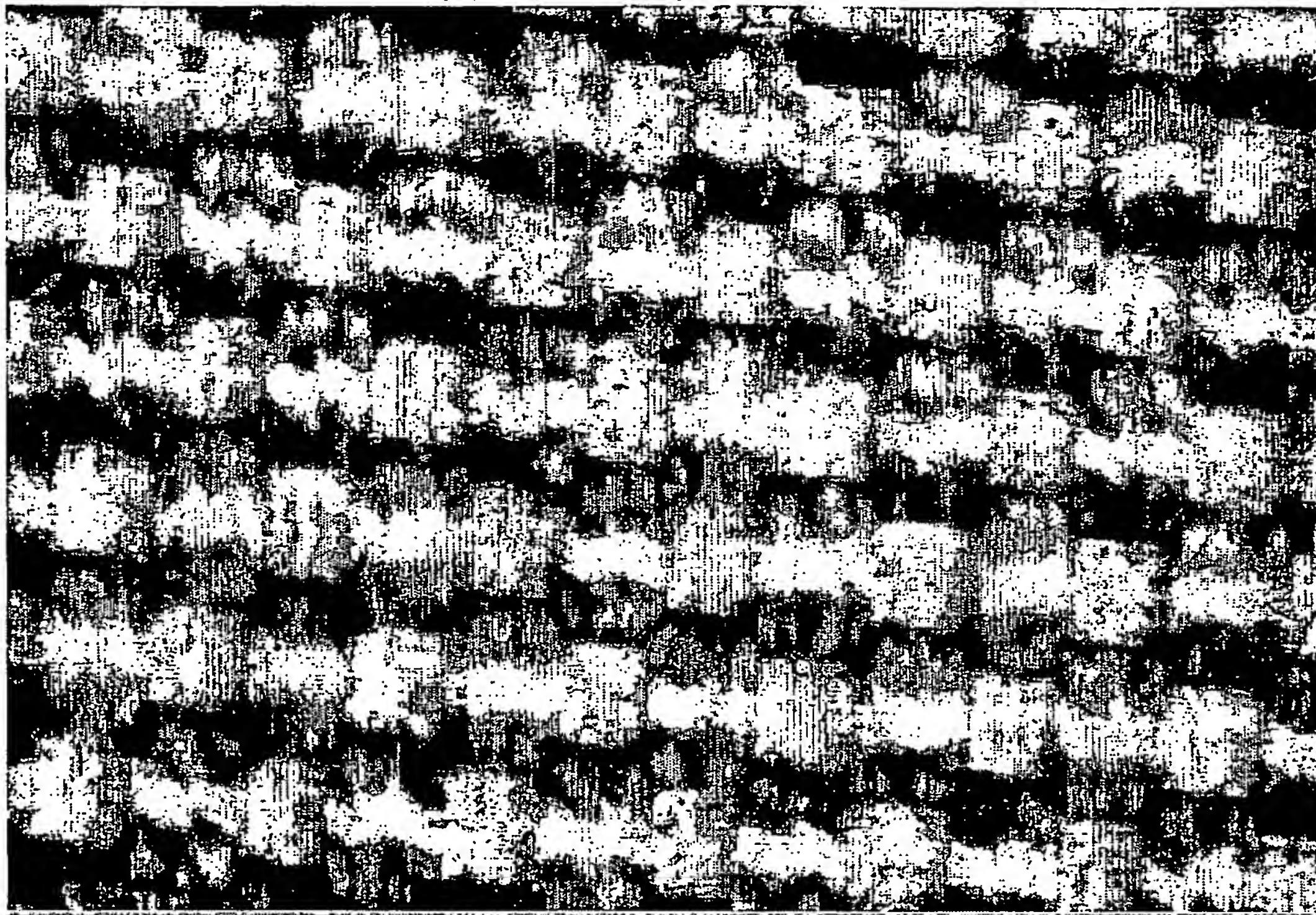
(von Kossa x100)

石灰化(−)

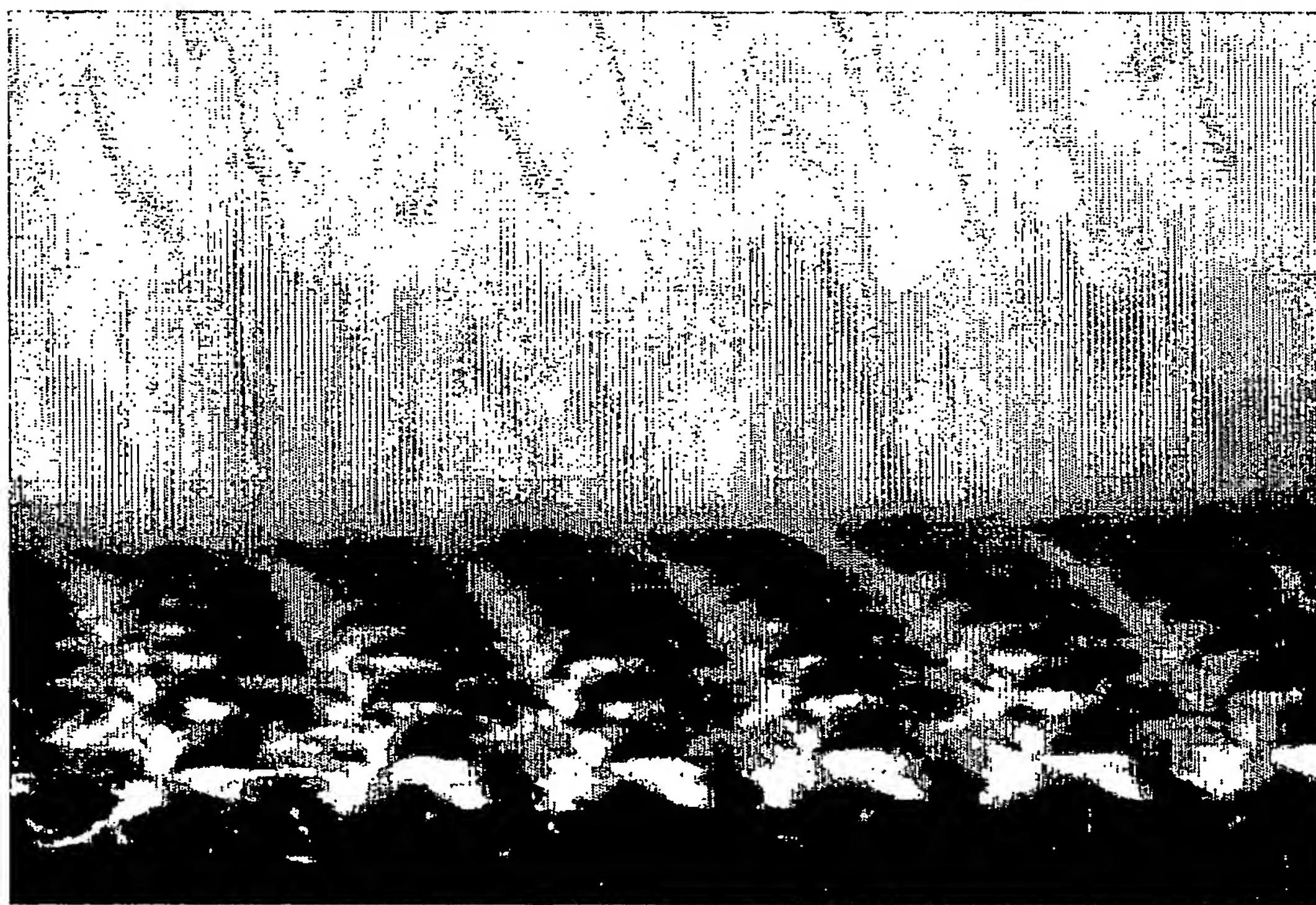
(von Kossa x100)

石灰化(++)

【図13】

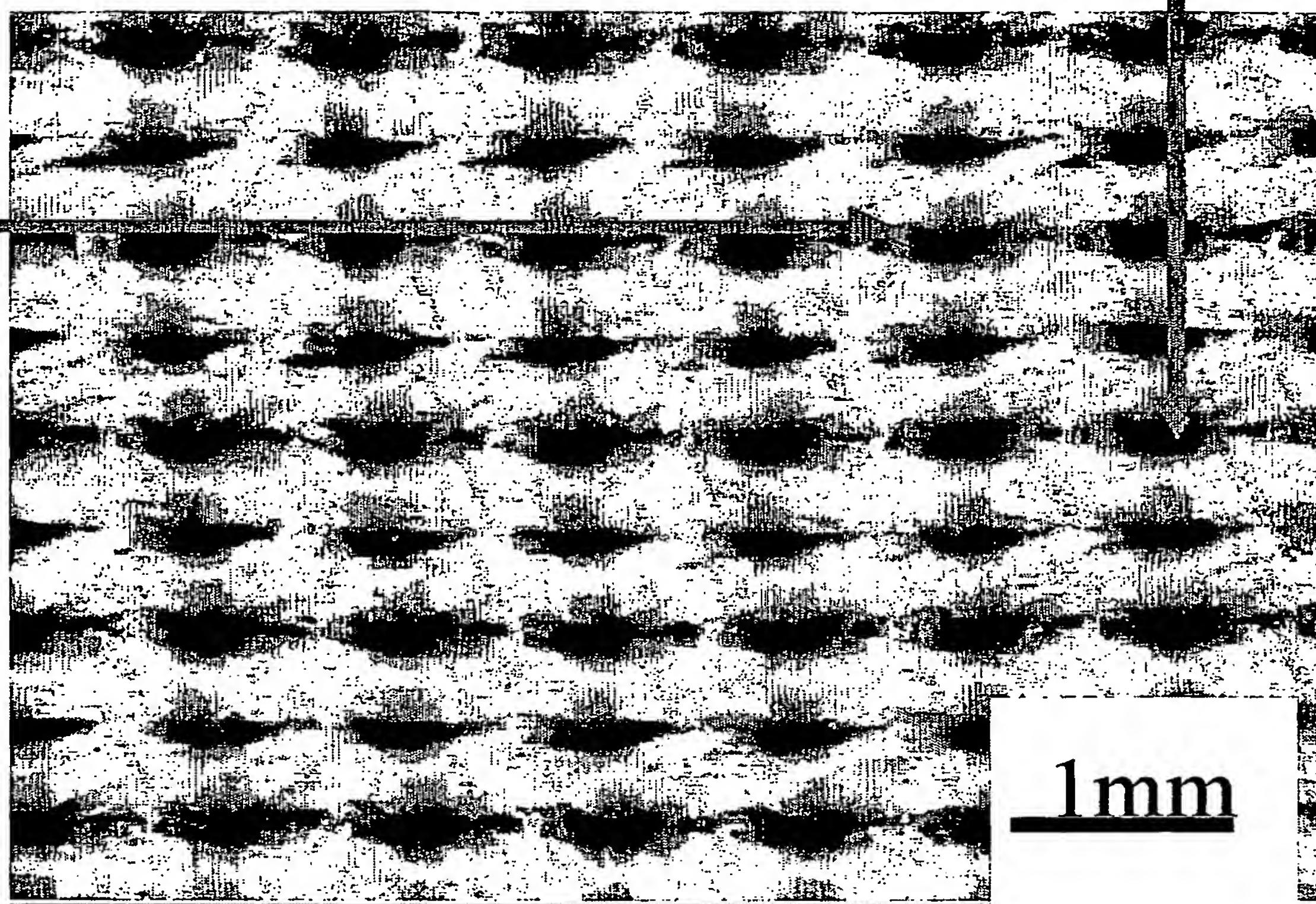


【図14】

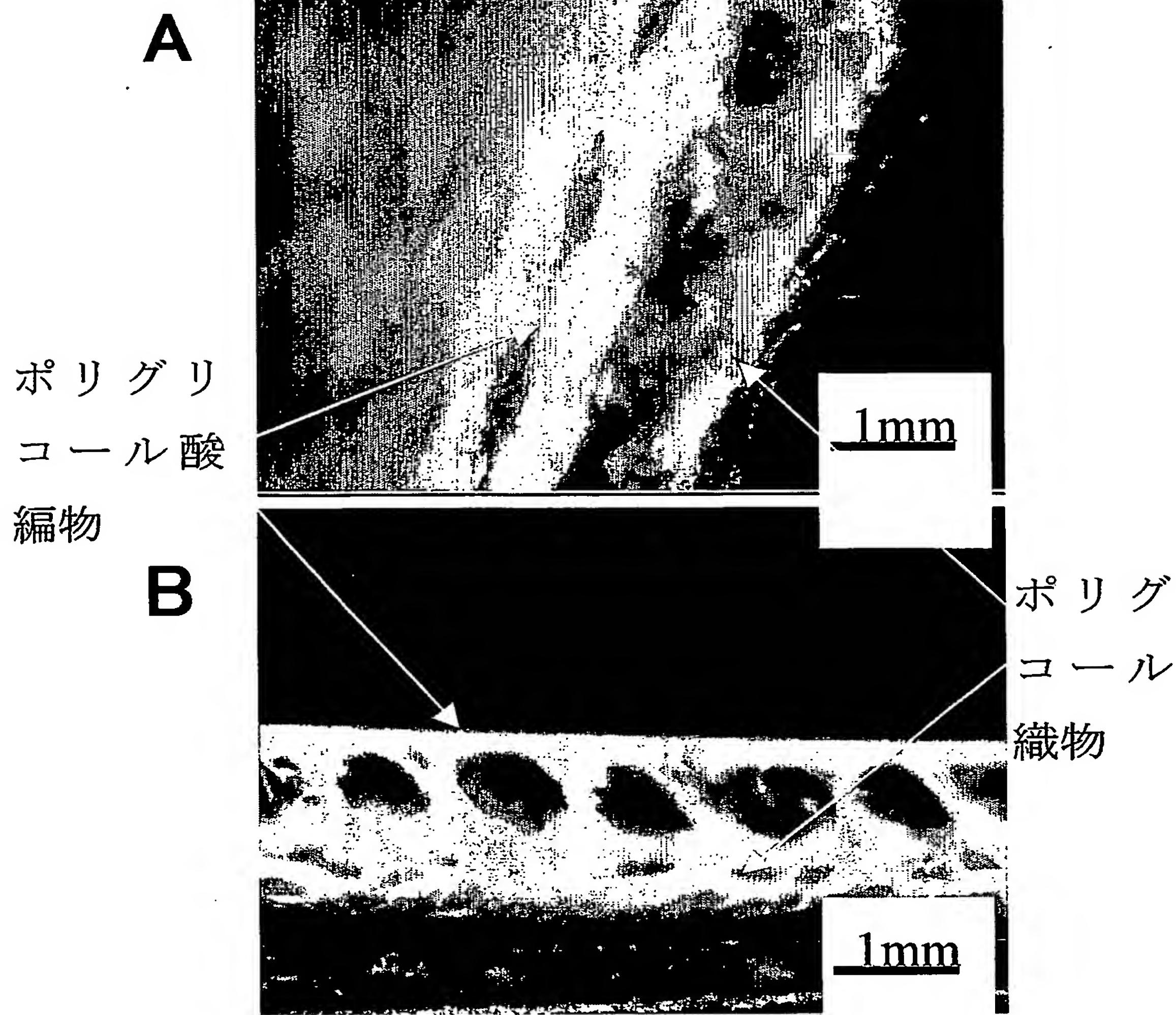


【図15】

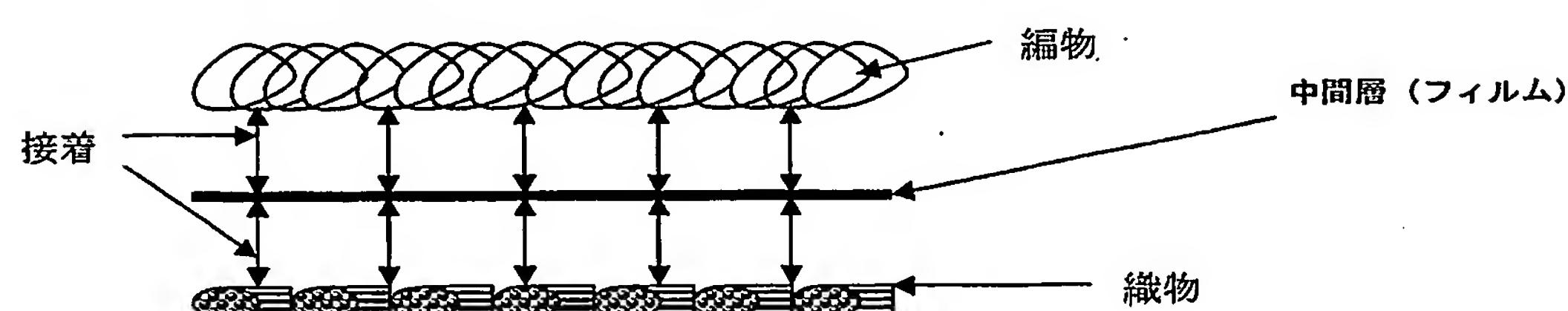
1

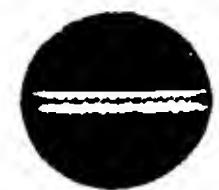


【図16】



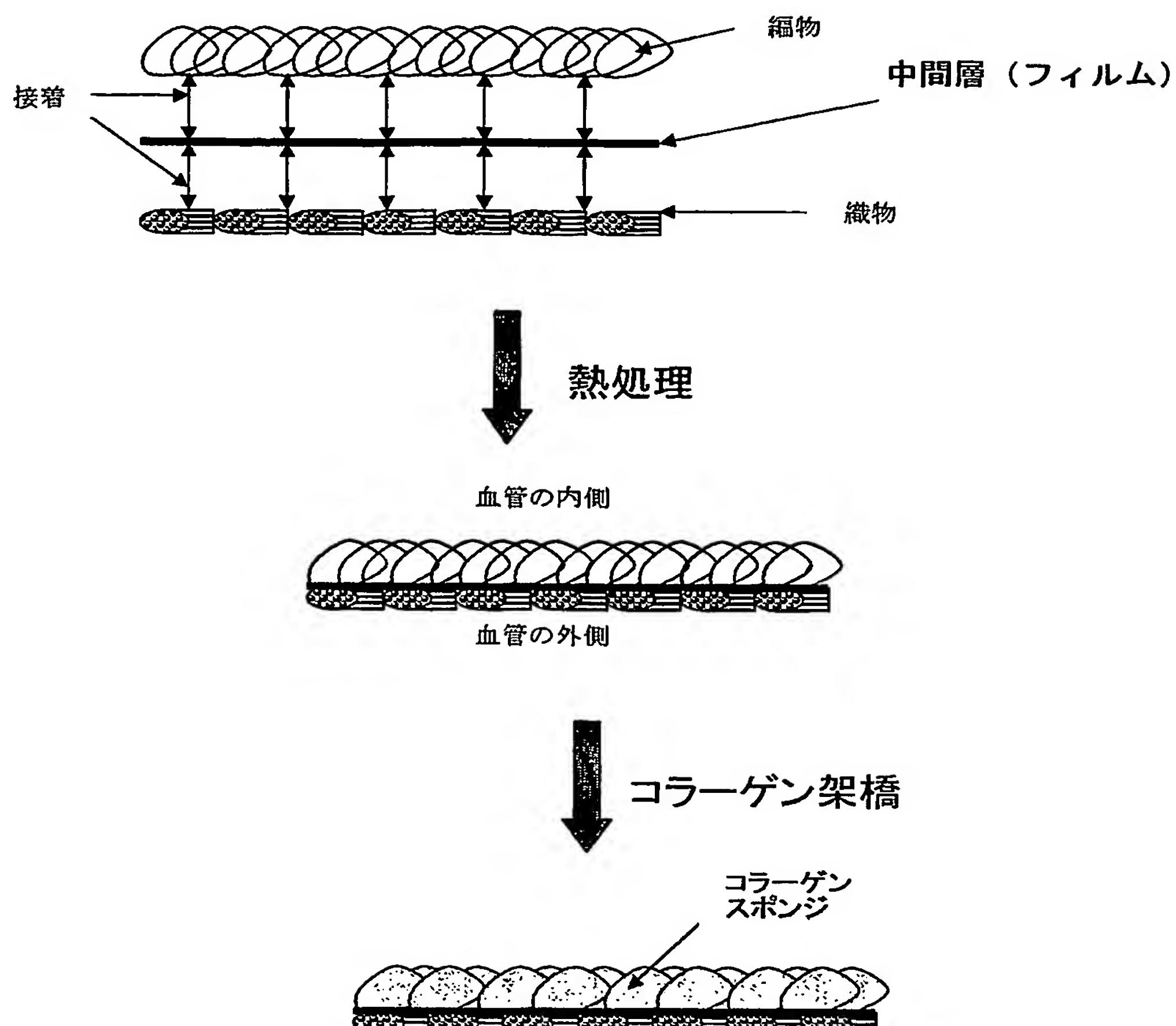
【図17】





【図18】

パッチの作成方法

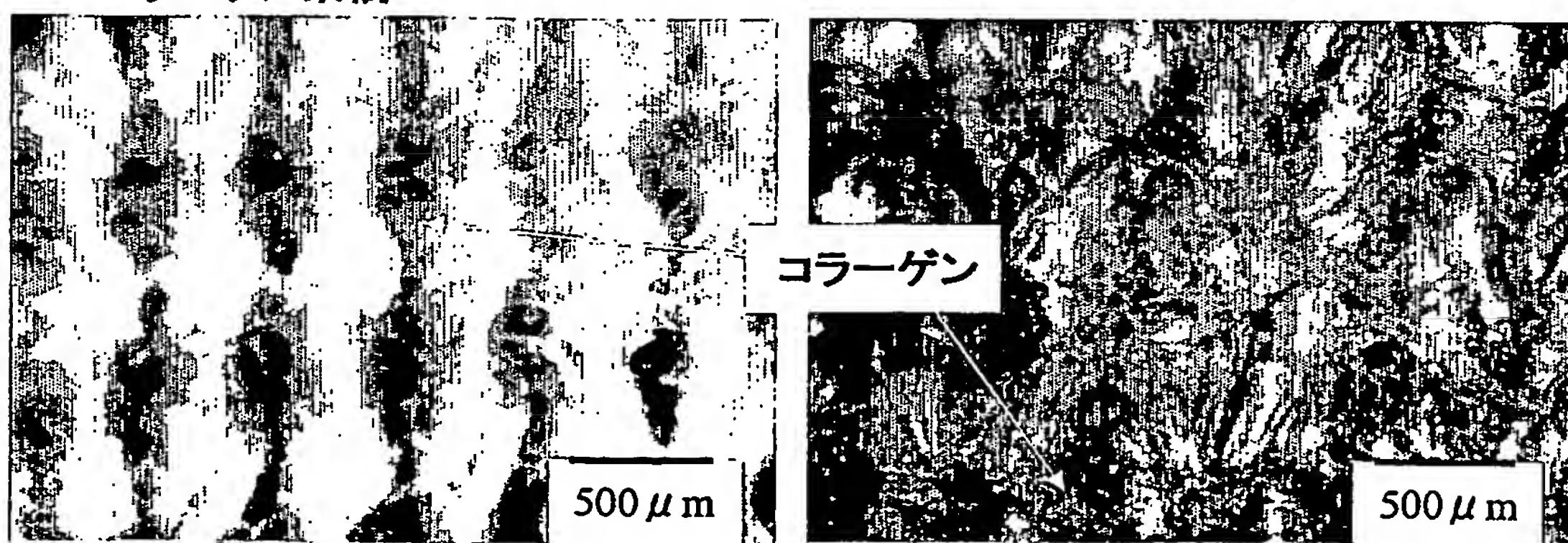


〔四〕 1 9 〕



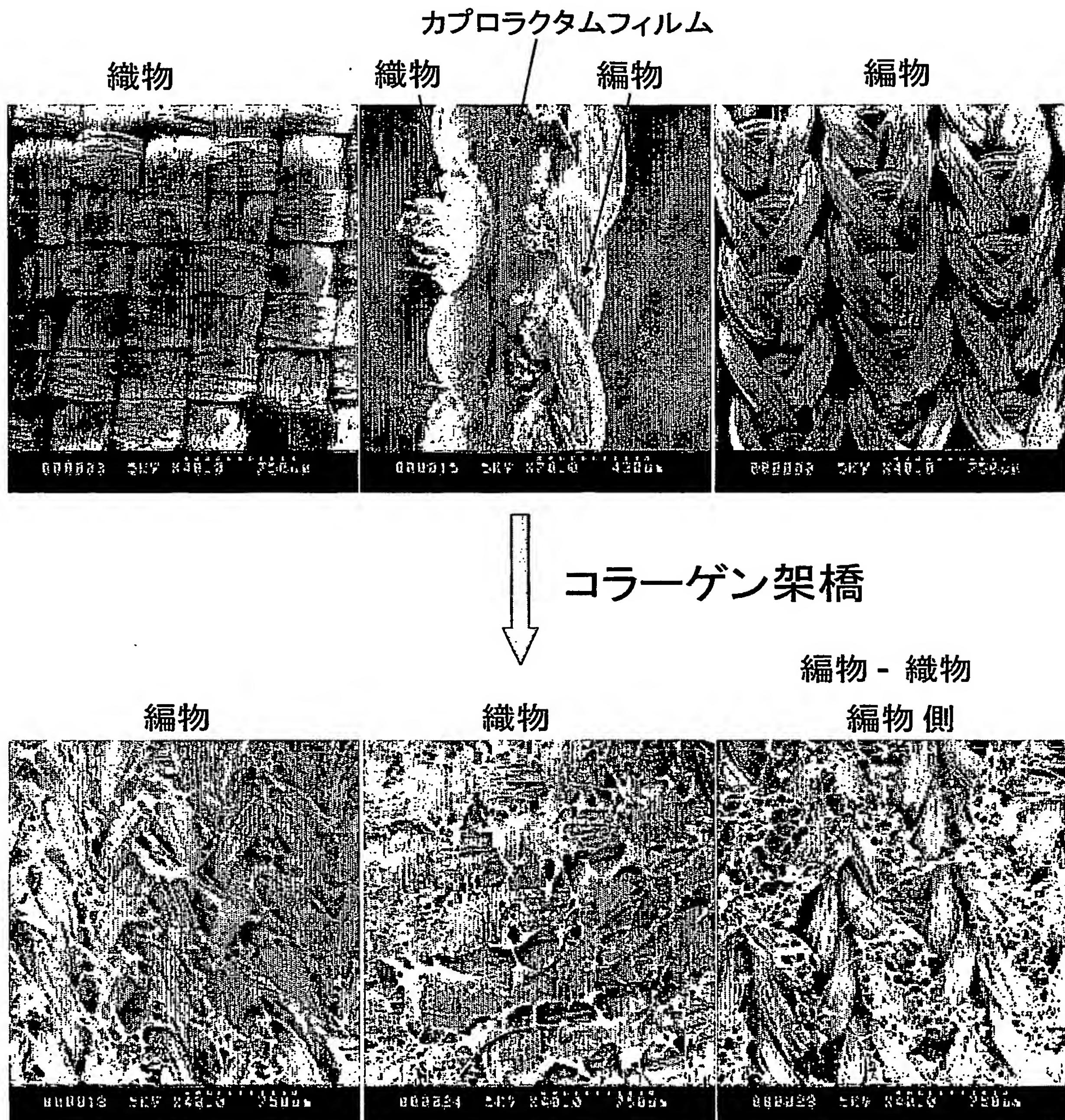
[四] 20]

コラーゲン架橋

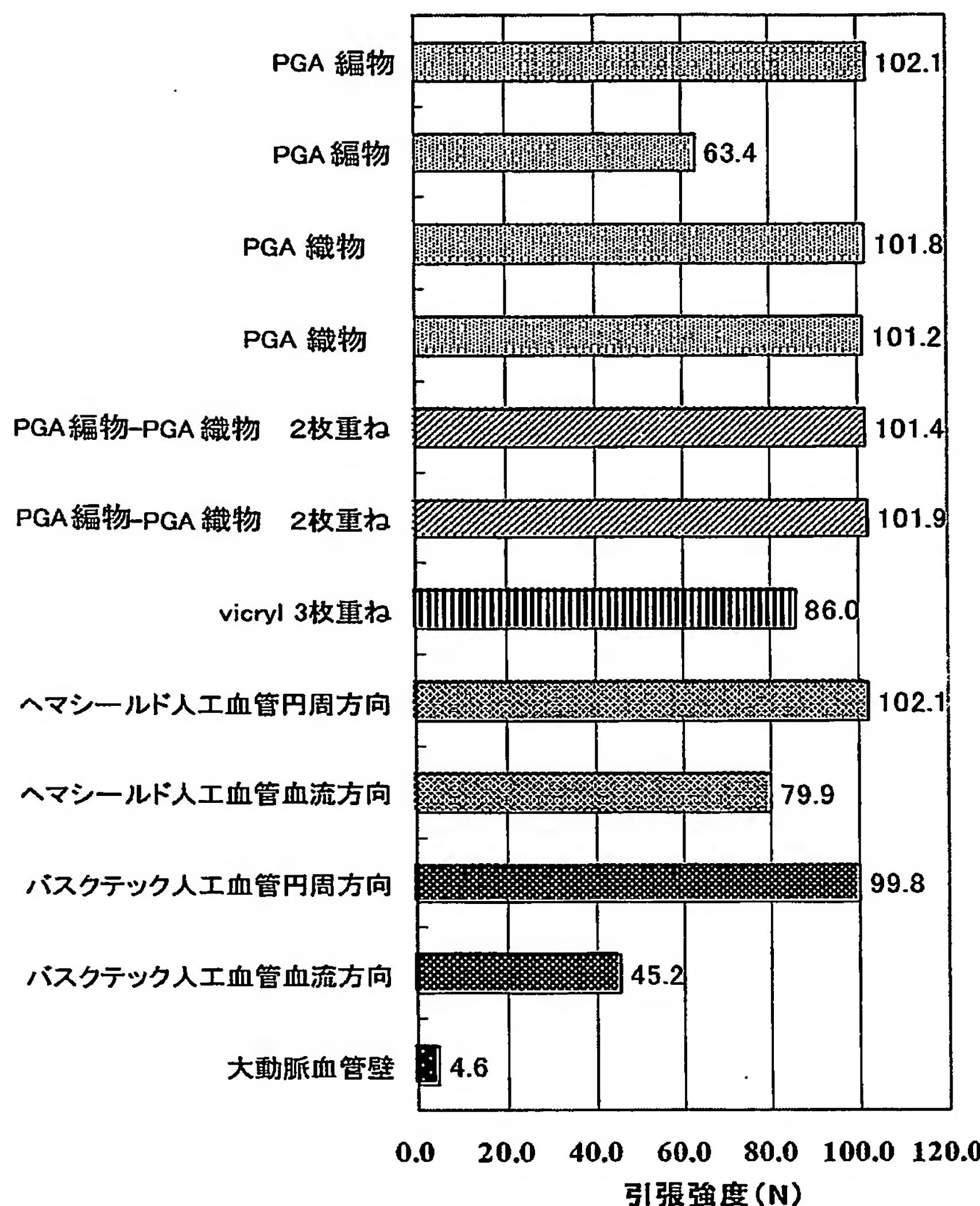


【図21】

編物 - 織物 2枚重ね

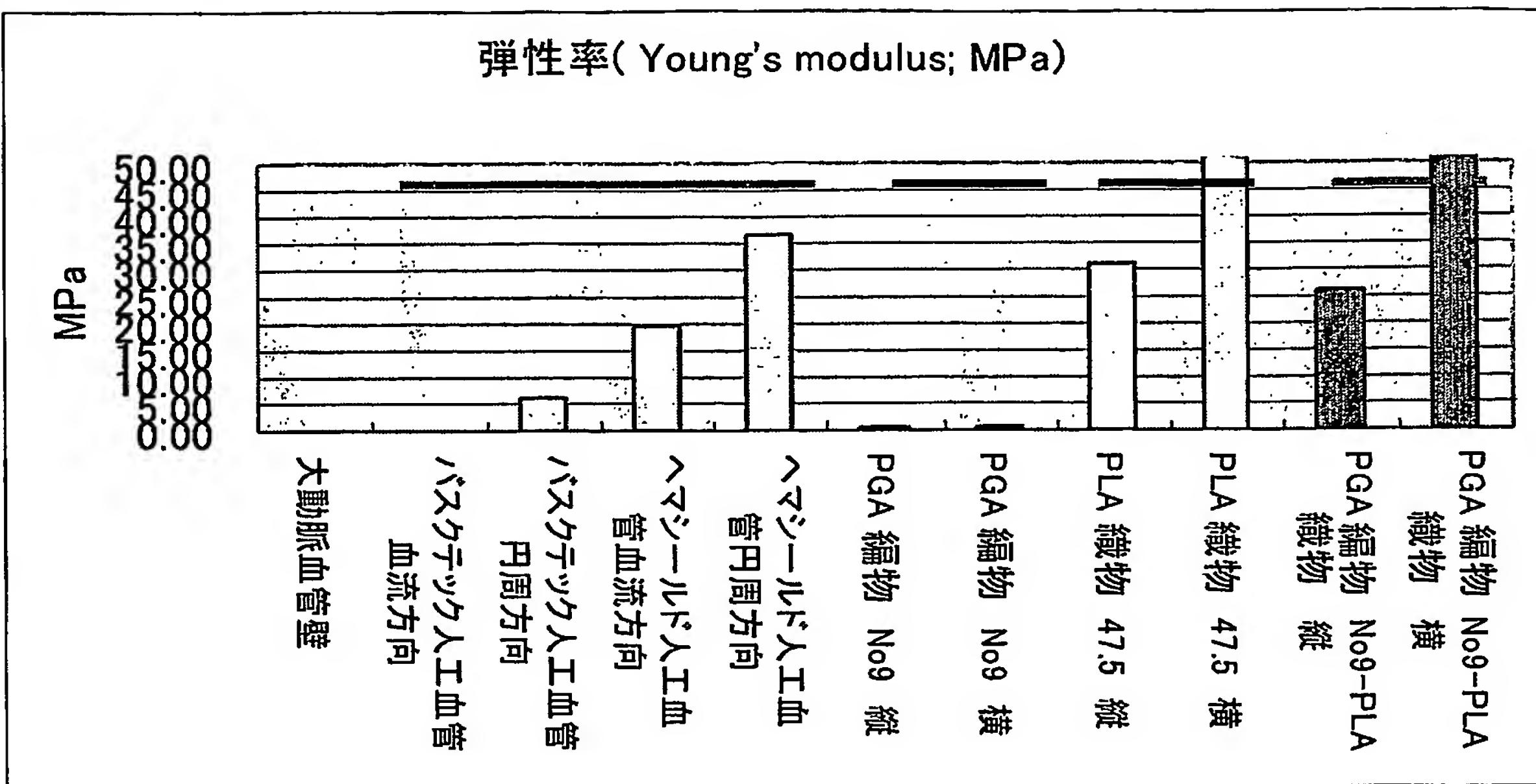


【図22】

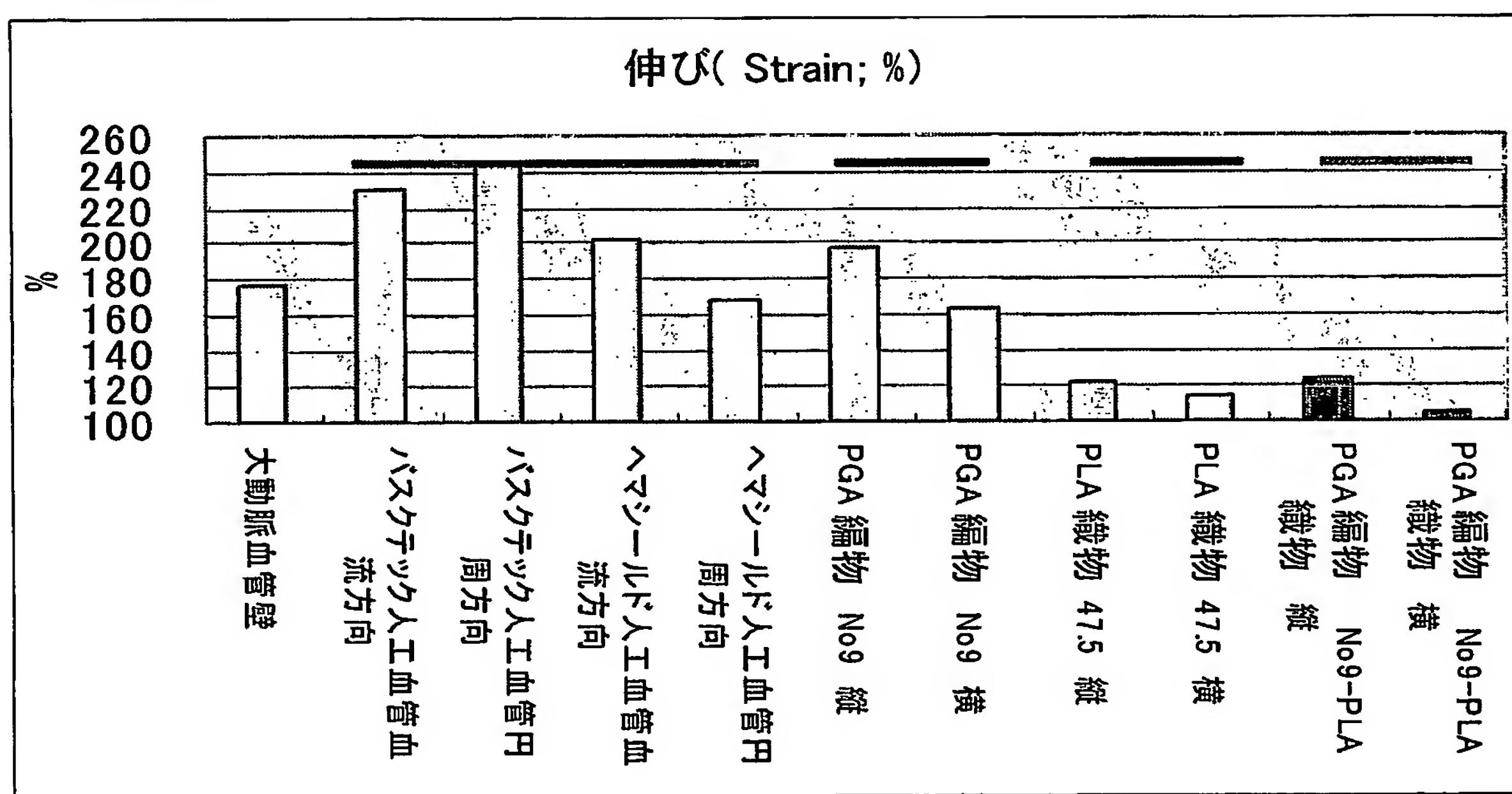


	引張強度 (N)
大動脈血管壁	4.6
バスケット人工血管血流方向	45.2
バスケット人工血管円周方向	99.8
ヘマシールド人工血管血流方向	79.9
ヘマシールド人工血管円周方向	102.1
vicryl 3枚重ね	86.0
PGA編物-PGA織物 2枚重ね	101.9
PGA編物-PGA織物 2枚重ね	101.4
PGA織物	101.2
PGA織物	101.8
PGA編物	63.4
PGA編物	102.1

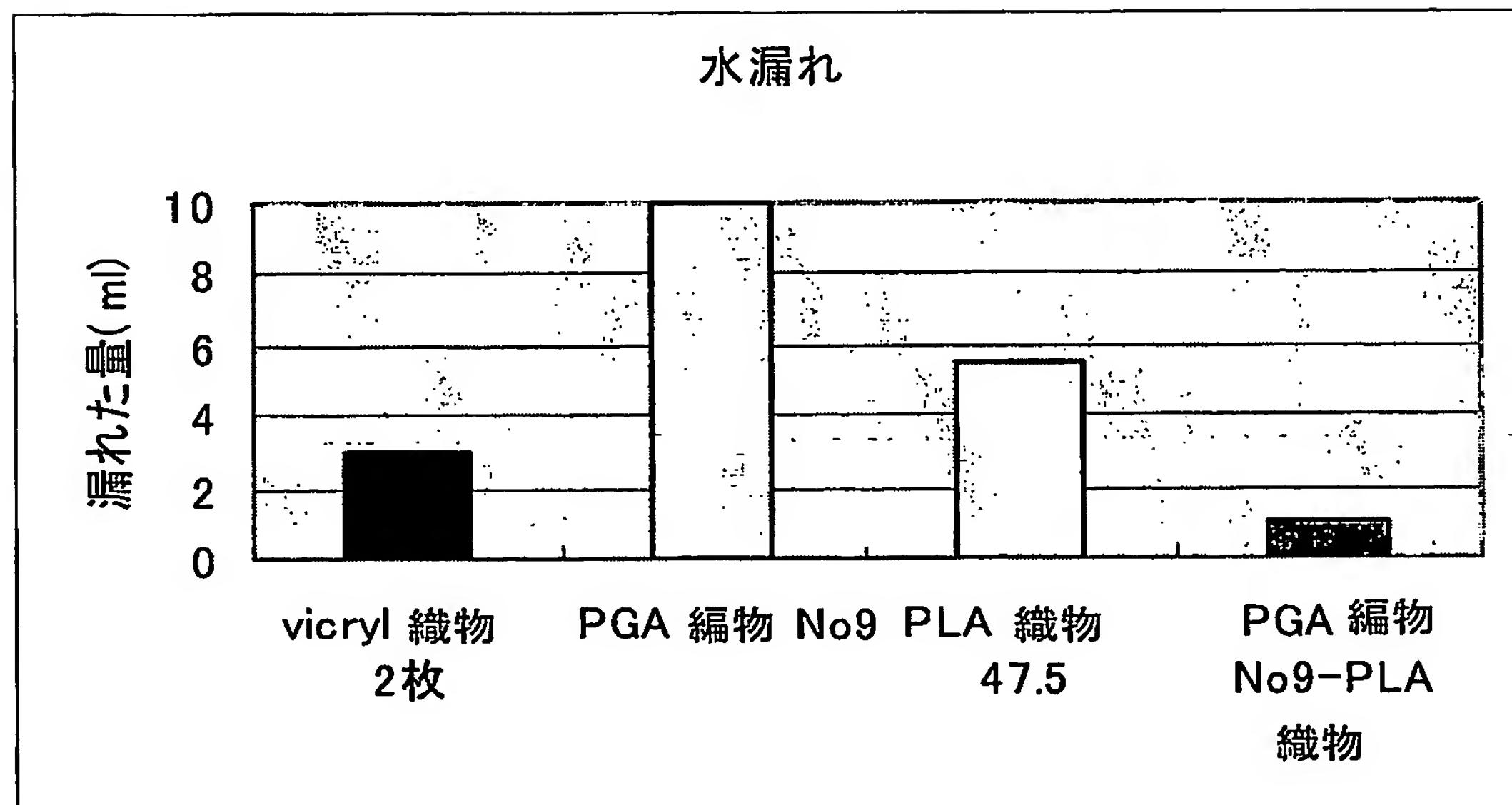
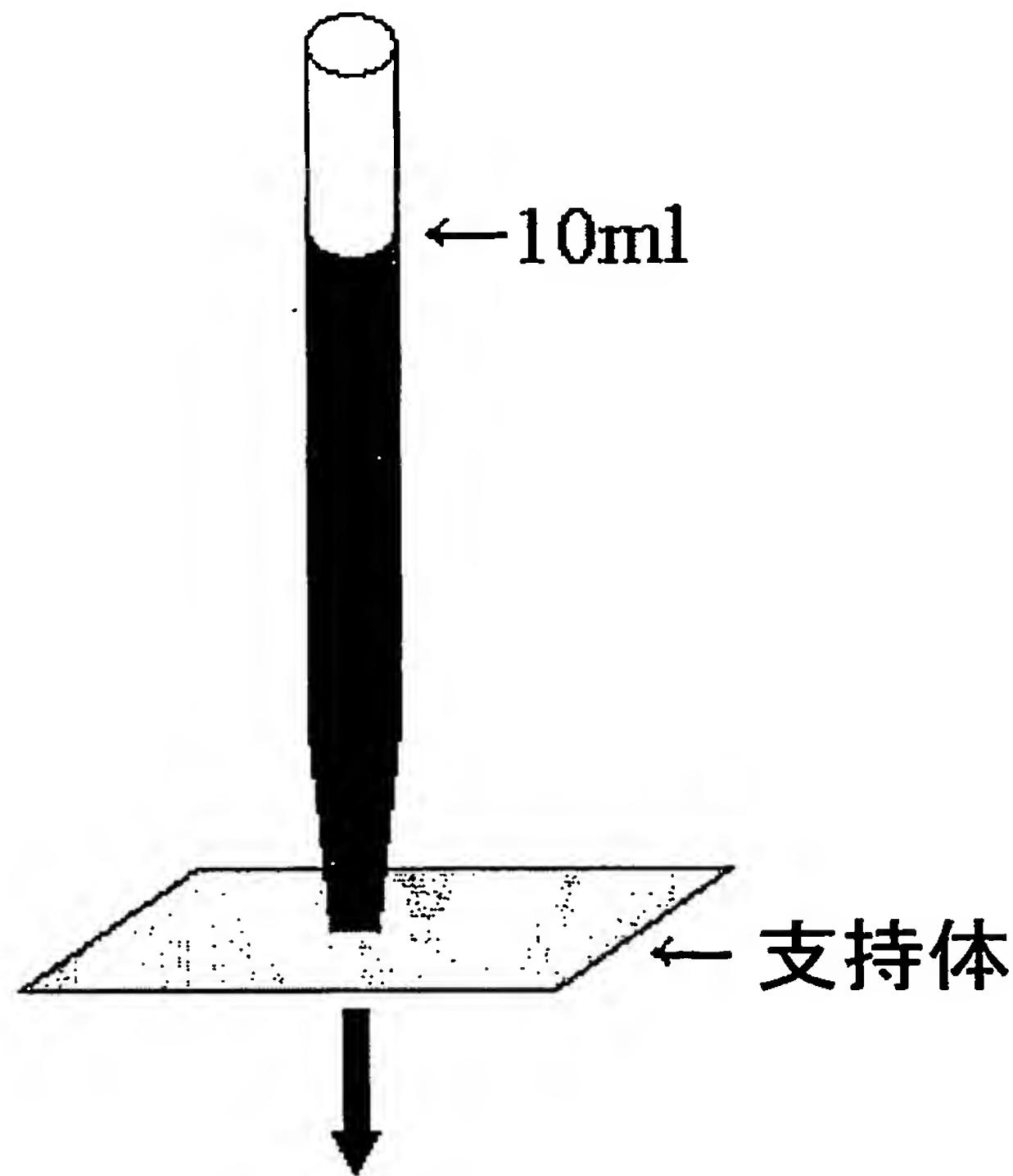
【図23】



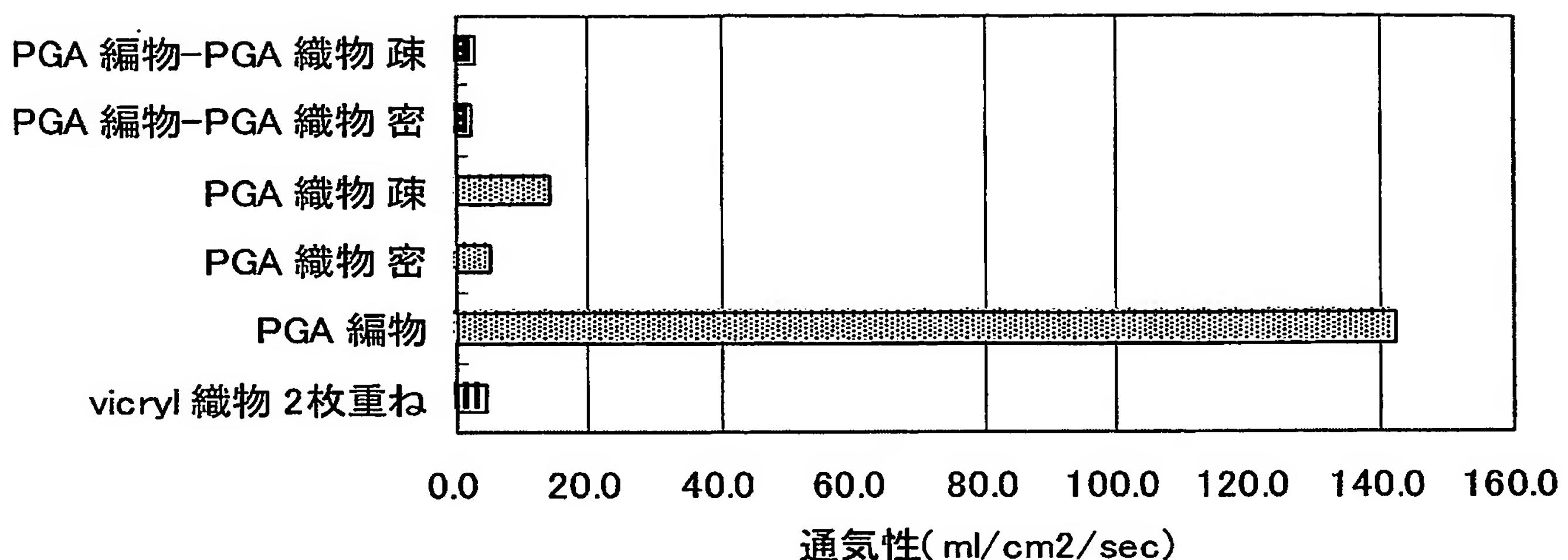
【図24】



【図25】



【図26】

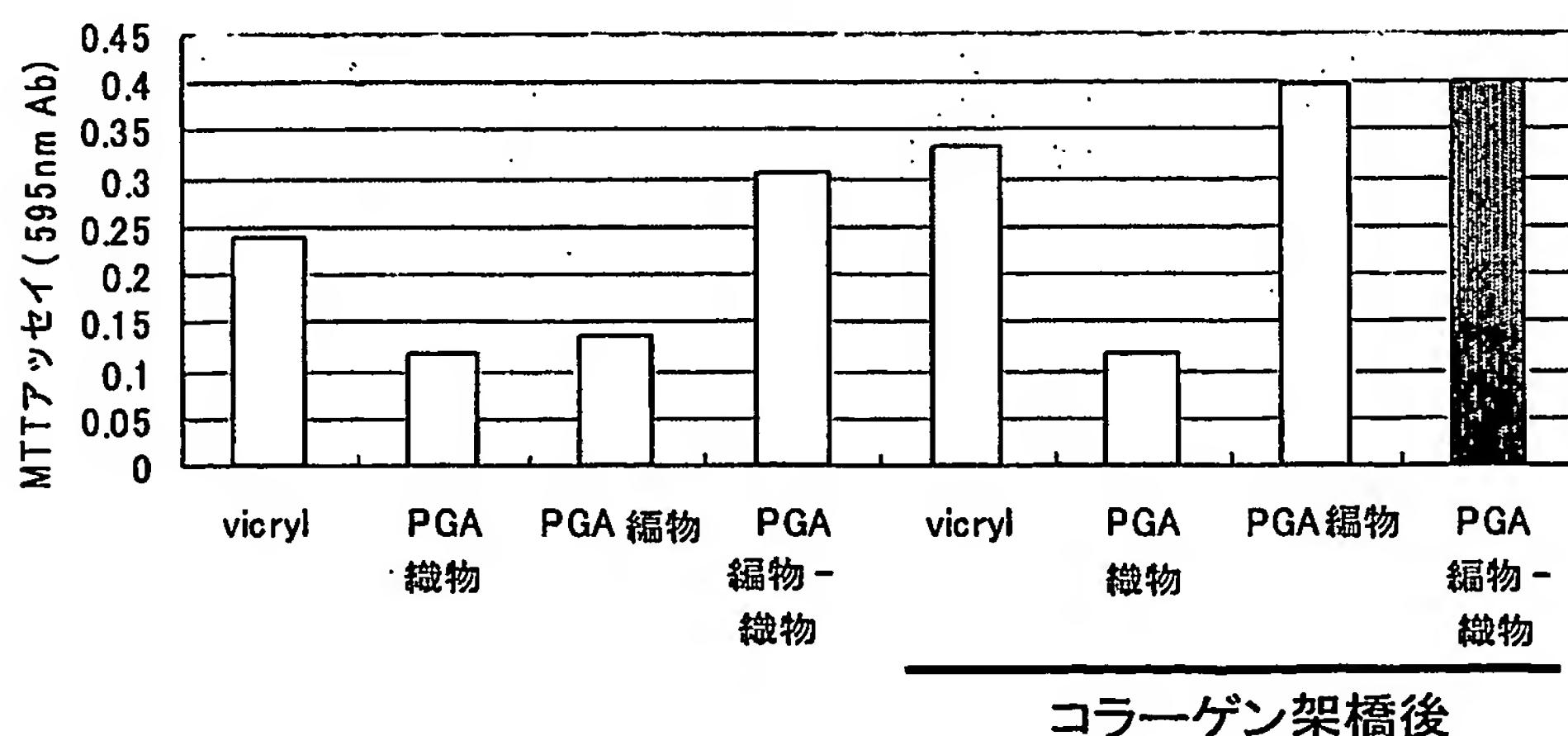
通気性(ml/cm²/sec)

通気性試験	通気性(ml/cm ² /sec)
vicryl織物2枚重ね	4.3
PGA編物	142.3
PGA織物密	5.1
PGA織物疎	14.1
PGA編物-PGA織物密	2.1
PGA編物-PGA織物疎	2.6

【図27】

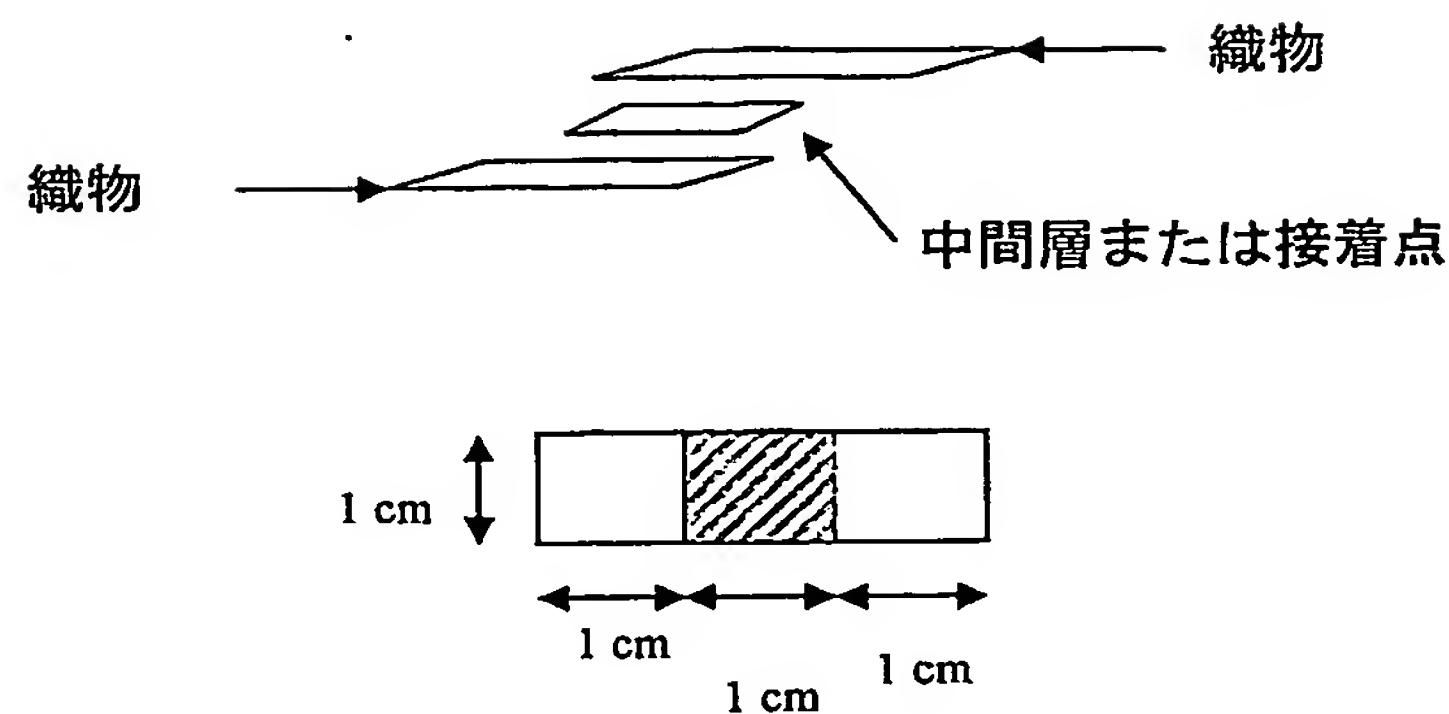
15時間後

細胞接着数

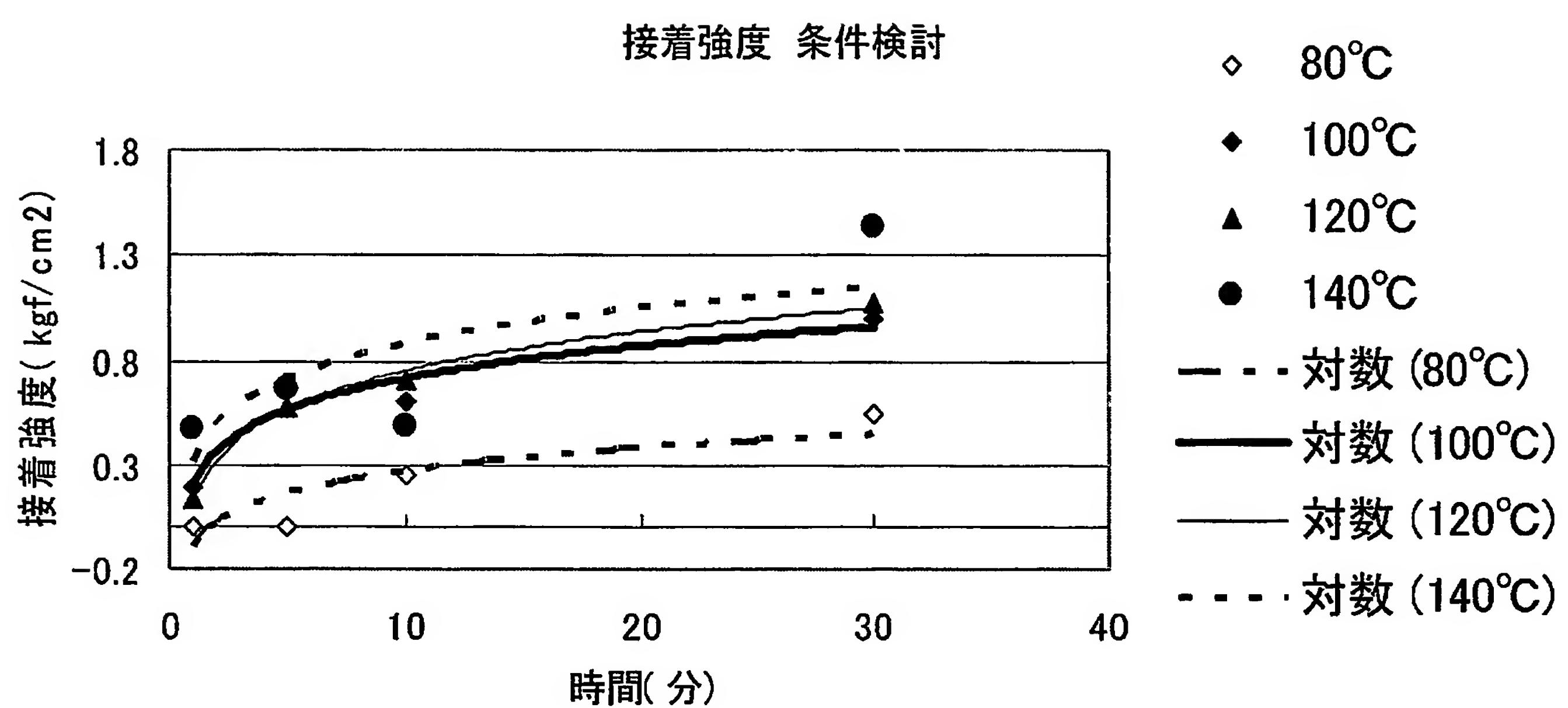


コラーゲン架橋後

【図28】

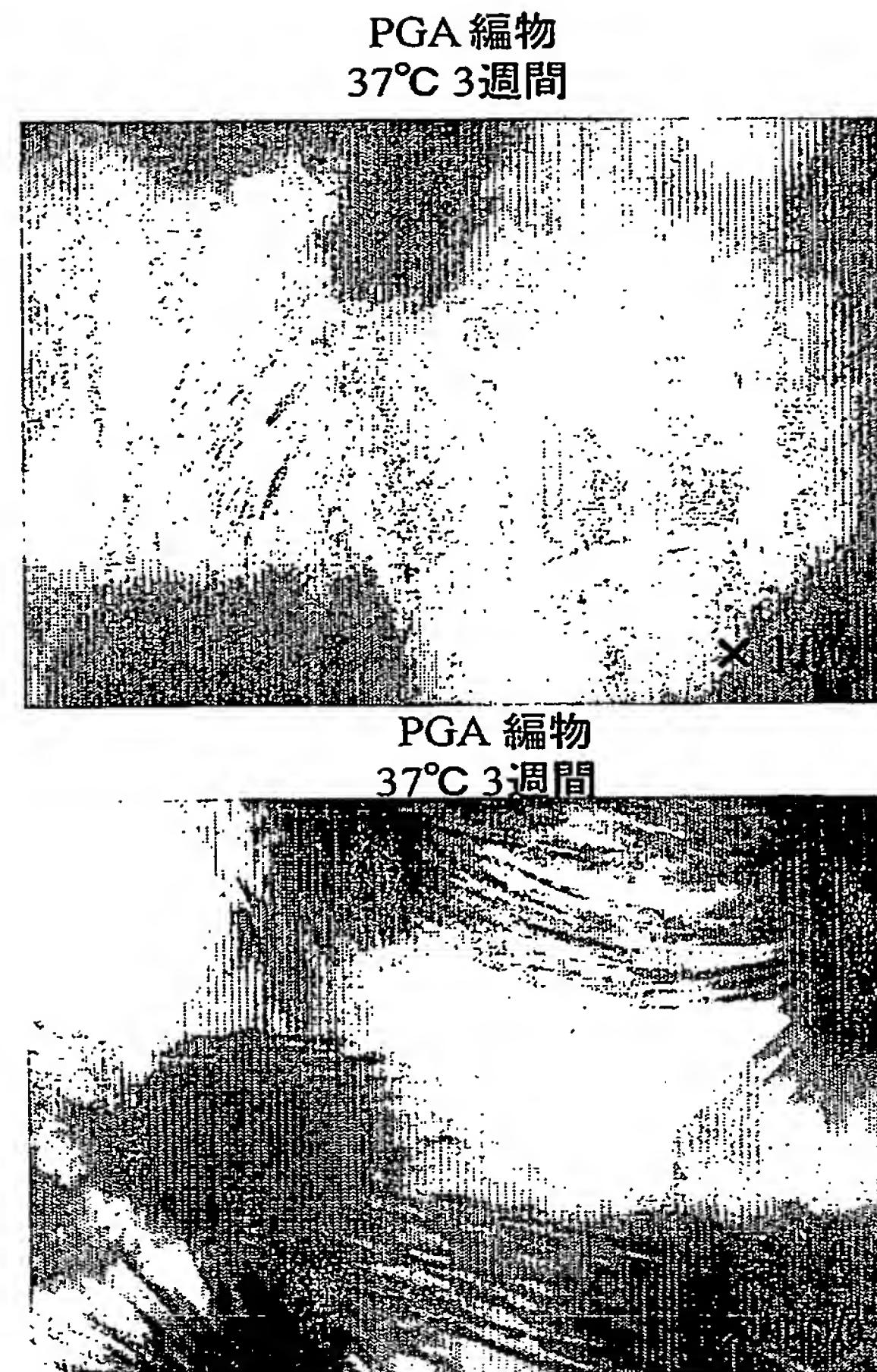
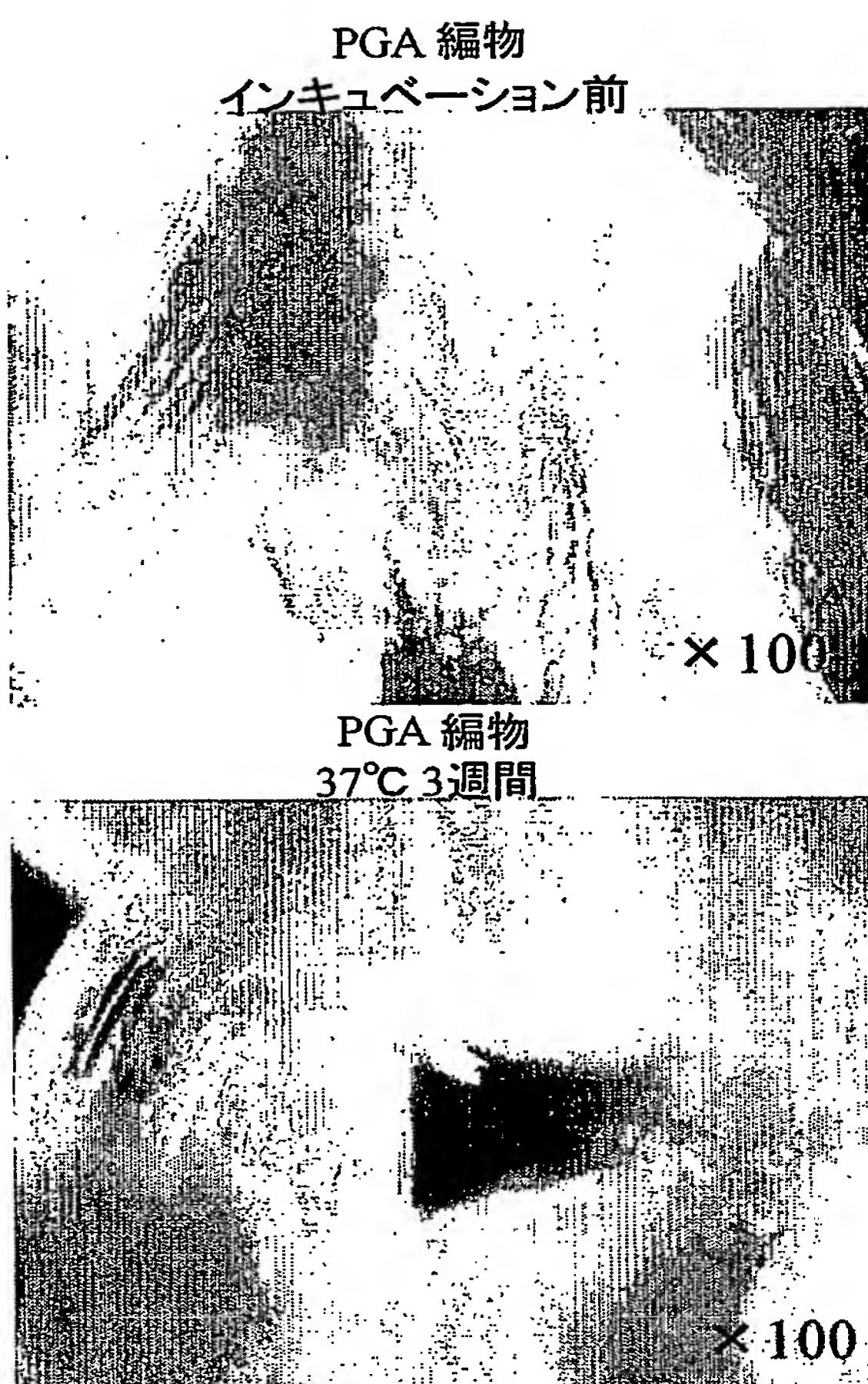


【図29】

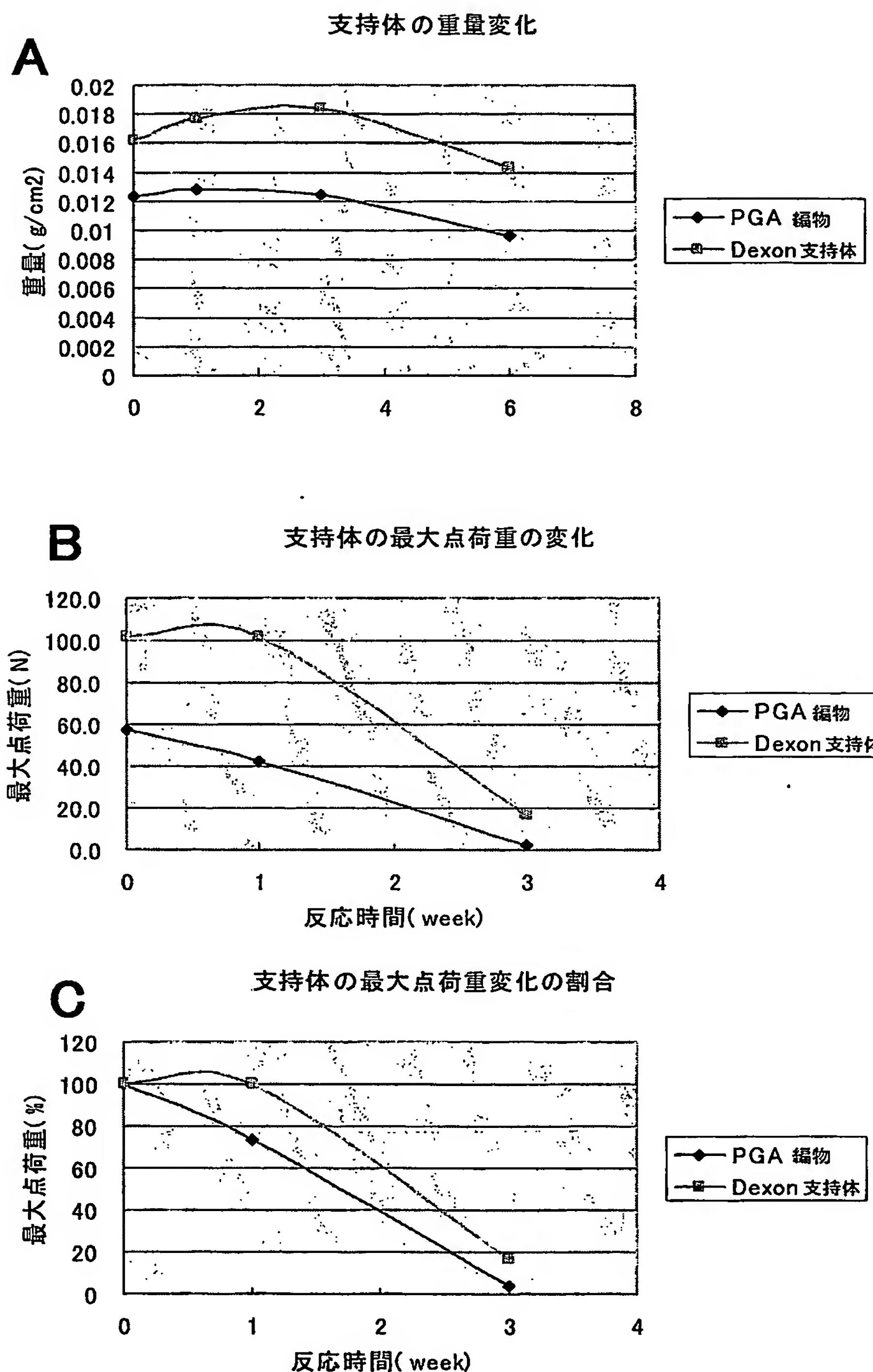


	80°C	100°C	120°C	140°C
1	0	0.1945	0.1363	0.4682
5	0	0.6553	0.5782	0.6634
10	0.257	0.6029	0.7035	0.4879
30	0.5395	0.9898	1.0695	1.4402

【図30】

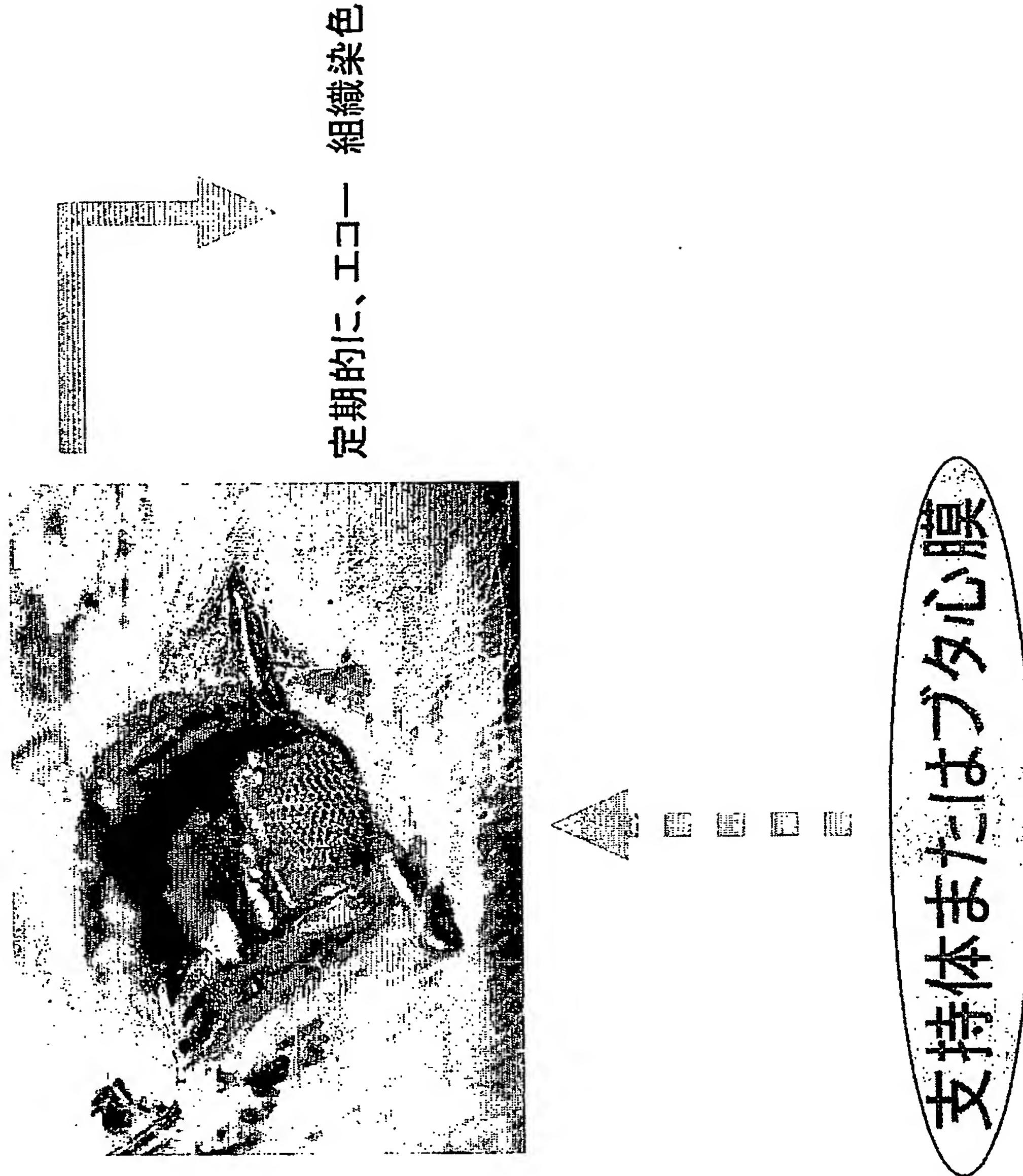


【図31】



【図32】

方法



【図 33】

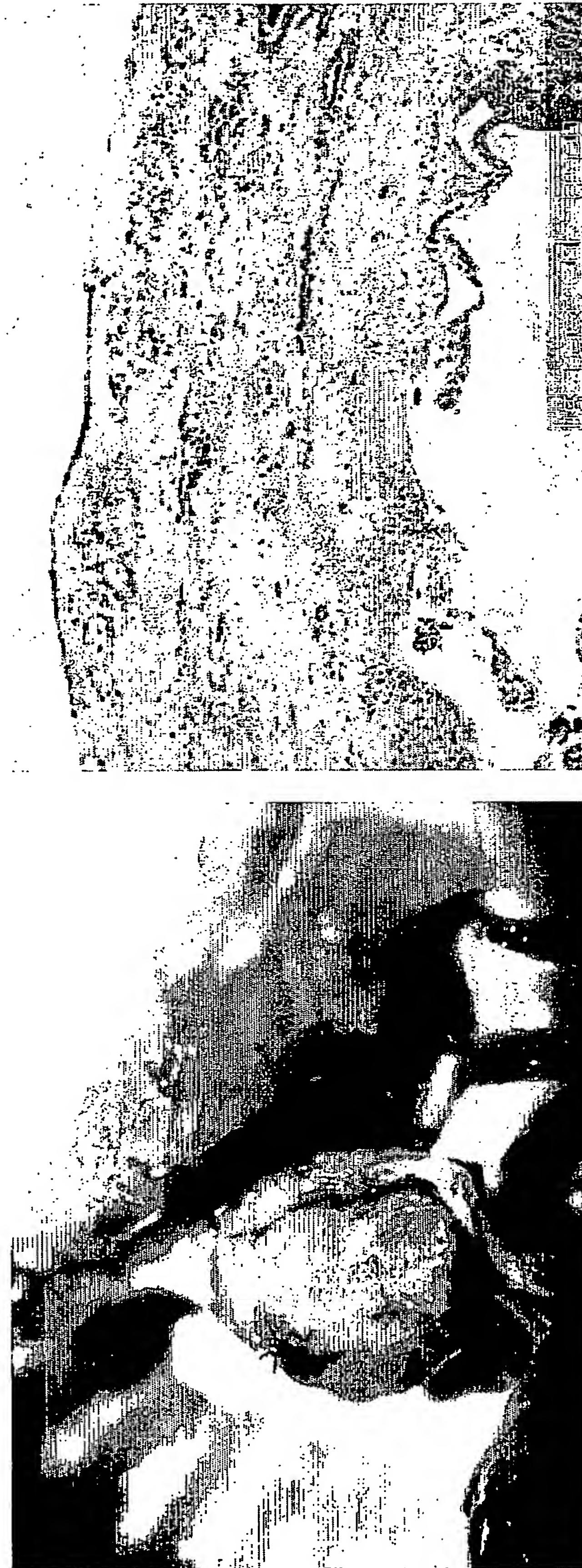
Rattig Sham
1ヶ月

HE染色
摘出写真



【図34】

ラットラバッヂチ移植
1ヶ月
HE染色
拠出写真



【図35】

ラットlig/pizzチ(colla I+IV)移植
1ヶ月

HE染色



【書類名】要約書

【要約】

【課題】

生体の臓器または組織の損傷などの処置において、自己化するような組織片を提供すること。

【解決手段】

従来は細胞を含ませることが必要であると考えられていた移植のための組織片の代わりに、生体分子と支持体とを含む生体適合性組織片を用いると、上述のような自己化する性質を具備することを予想外に発見したことにより上記課題を解決した。したがって、本発明は、生体適合性組織片であって、A) 生体分子；およびB) 支持体、を含む、生体適合性組織片を提供する。本発明はまた、A) 粗面を有する第一層；およびB) 生体内衝撃に耐え得る強度を有する第二層、を含み、該第一層と該第二層とが少なくとも1点で接着される、生体適合性組織支持体を提供する。

【選択図】 なし

特願 2003-320491

出願人履歴情報

識別番号 [502100138]
1. 変更年月日 2002年10月23日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市北区天満4-15-5-302
氏 名 株式会社カルディオ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.